

## 비소세포폐암주에서 산소 농도에 따른 미세 배양 환경과 세포 증식능

중앙대학교 의과대학 내과학교실

신중욱, 전은주, 박희원, 송주한, 이영우, 정재우, 최재철, 김재열, 박인원, 최병휘

### Microenvironments and Cellular Proliferation Affected by Oxygen Concentration in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line

Jong Wook Shin, M.D., Eun Ju Jeon, M.D., Hee Won Kwak, M.D., Ju Han Song, M.D., Young Woo Lee, M.D., Jae Woo Jeong, M.D., Jae Cheol Choi, M.D., Jae-Yeol Kim, M.D., In Won Park, M.D., Byoung Whui Choi, M.D.

Division of Allergy, Respiratory and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Chung Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Abnormal angiogenesis can induce hypoxia within a highly proliferating tumor mass, and these hypoxic conditions can in turn create clinical problems, such as resistance to chemotherapy. However, the mechanism by which hypoxia induces these changes has not yet been determined. Therefore, this study was conducted to determine how hypoxia induces changes in cell viability and extracellular microenvironments in an in vitro culture system using non-small cell lung cancer cells.

**Methods:** The non-small cell lung cancer cell line, A549 was cultured in DMEM or RPMI-1640 media that contained fetal bovine serum. A decrease in the oxygen tension of the media that contained the culture was then induced in a hypoxia microchamber using a CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> gas mixture. A gas analysis and an MTT assay were then conducted.

**Results:** (1) The decrease in oxygen tension was checked the anaerobic gas mixture for 30 min and then reoxygenation was induced by adding a 5% CO<sub>2</sub>-room air gas mixture to the chamber. (2) Purging with the anaerobic gas mixture was found to decrease the further oxygen tension of cell culture media. (3) The low oxygen tension resulted in a low pH, lactic acidosis and a decreased glucose concentration in the media. (4) The decrease in glucose concentration that was observed as a result of hypoxia was markedly different when different types of media were evaluated. (5) The decrease in oxygen tension inhibited proliferation of A549 cells.

**Conclusion:** These data suggests that tumor hypoxia is associated with acidosis and hypoglycemia, which have been implicated in the development of resistance to chemotherapy and radiotherapy. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 63: 242-250)

**Key Words:** Non-small cell lung cancer, Hypoxia, Oxygen, A549, Microenvironment.

## 서 론

비소세포폐암은 기관지폐포암의 70%를 차지하며 진단 당시 이미 진행해 있는 암이 대부분이다. 또한, 항암화학요법이나 방사선에 대한 성적이 다른 장기의 고형암이나 혈액암보다 낮아서 치명률이 가장 높은 암이다. 시간이나 암 조직형 별로 암세포의 증식 속도나 대사 상태는 다양하며 같은 종괴라 하더라도 종괴

중심에서의 위치에 따라 암세포의 증식 속도가 다양하며, 종양혈관 형성의 효율성에 따라 서로 다른 상대적인 산소 분압이나 영양 공급을 받아 같은 종괴 내에서 각 암세포는 병태생물학적 현상을 달리한다<sup>1</sup>. 즉 같은 종괴 내 비소세포폐암이라 할지라도 종괴의 크기, 종양 혈관 형성의 효율성 등은 암세포의 유전적 발현을 현저하게 변화시킴으로써 항암 화학 요법이나 방사선 치료에 대한 반응을 달리하고 원격 전이나 치료 후 재발 등에도 치료자가 예상하지 못하는 방향으로 나타날 수 있을 것이다<sup>2-4</sup>. 이러한 종양 내 세포의 생물학적 현상이 달라지는 기전 중에는 저산소증이 중요한 기여를 할 것으로 보인다. 저산소증과 암과의 관계는 다른 암세포에서도 비교적 밝혀지고 있는 사실이다<sup>5,6</sup>. 저산소증은 항암 화학 요법에 높은 저항을 보이는 비소세포폐암과 밀접한 관련이 있다<sup>7,8</sup>.

저산소증은 HIF-1α의 발현을 증가시키고 HIF-1α

Address for correspondence: In Won Park, M.D.  
Division of Allergy, Respiratory and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Chung-Ang University Hospital, 224-1, Huksuk-dong, Dongjak-gu, 156-755, Seoul, Korea  
Phone: 82-2-6299-1401, Fax: 82-2-6263-2184  
E-mail: iwpark@cau.ac.kr, basthma@hanmail.net  
Received: May. 30. 2007  
Accepted: Sep. 14. 2007

는 EGFR이나 이 것의 리간드를 발현시키며, 또한 증가된 EGFR은 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 증가시킨다<sup>9,10</sup>. 체외 실험에서는 폐선암 세포주인 A549에 저산소증을 가할 경우 세포의 이동성이 증가되기도 하였다<sup>11</sup>. VEGF 또한 저산소에 노출된 암세포에서 자살 유전자를 유도할 수도 있다<sup>12</sup>. 그리고, 다양한 수준의 저산소증에 노출된 폐암세포를 SPECT를 이용하여 영상화하여 방사선 치료에 응용하려는 시도도 최근에 이뤄지고 있다<sup>13</sup>. 그러나 다양한 저산소증 수준에서 폐암 세포의 세포학적 또는 유전적 발현에 대한 구체적인 연구는 아직 미비한 실정이다. 저산소증에 대한 세포의 반응은 다양하고 어떤 세포는 저산소증에 대하여 더 저항성을 가질 수도 있다. 이러한 저산소증의 효과를 보기 위한 체외 실험은 여러 가지 방법들이 있으며 저마다 특성이 있는 반면, 다양하거나 상반된 결과들을 보여주고 있다. 그리고 저산소증은 대사 과정과 밀접한 관련이 있다.

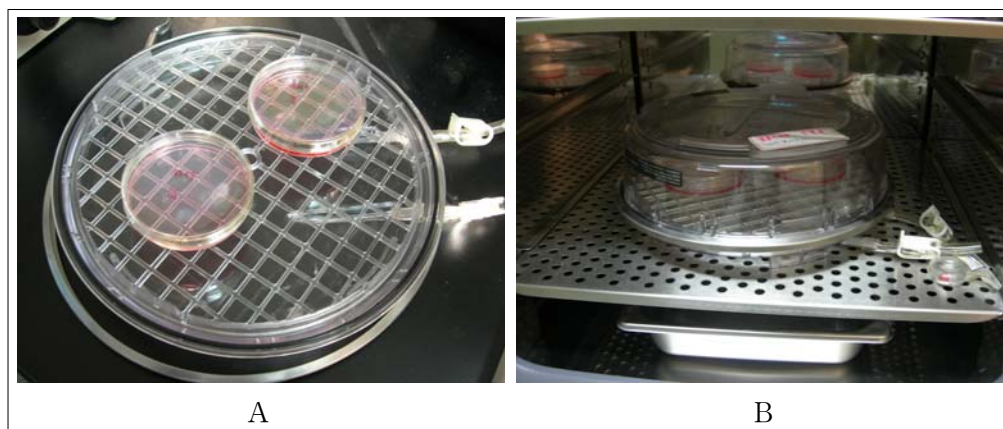
저산소증을 만들기 위한 기존의 방법은 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기를 이용하기 때문에 불편한 점이 있으며, 다양한 산소의 농도를 만들기에는 비용 대비 효율성이 낮았다. 본 연구에서는 일반적으로 세포 배양에 쓰이는 큰 크기의 세포배양기 대신에 실험대 위에 올려놓고 조작할 수 있는 비교적 작은 크기의 세포 배양 챔버를 이용함으로써 산소 농도를 조정하였다.

지금까지 세포 내 저산소 환경과 관련하여 임상적

으로 중요한 수치들에 대한 연구가 많지 않았다. 이에 따라, 저자들은 본 연구를 통하여 비소세포 폐암 세포주를 이용하여 체외 배양하였을 때 세포 배양액 내 환경을 조사하고 비소세포폐암주의 증식에 저산소증이 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

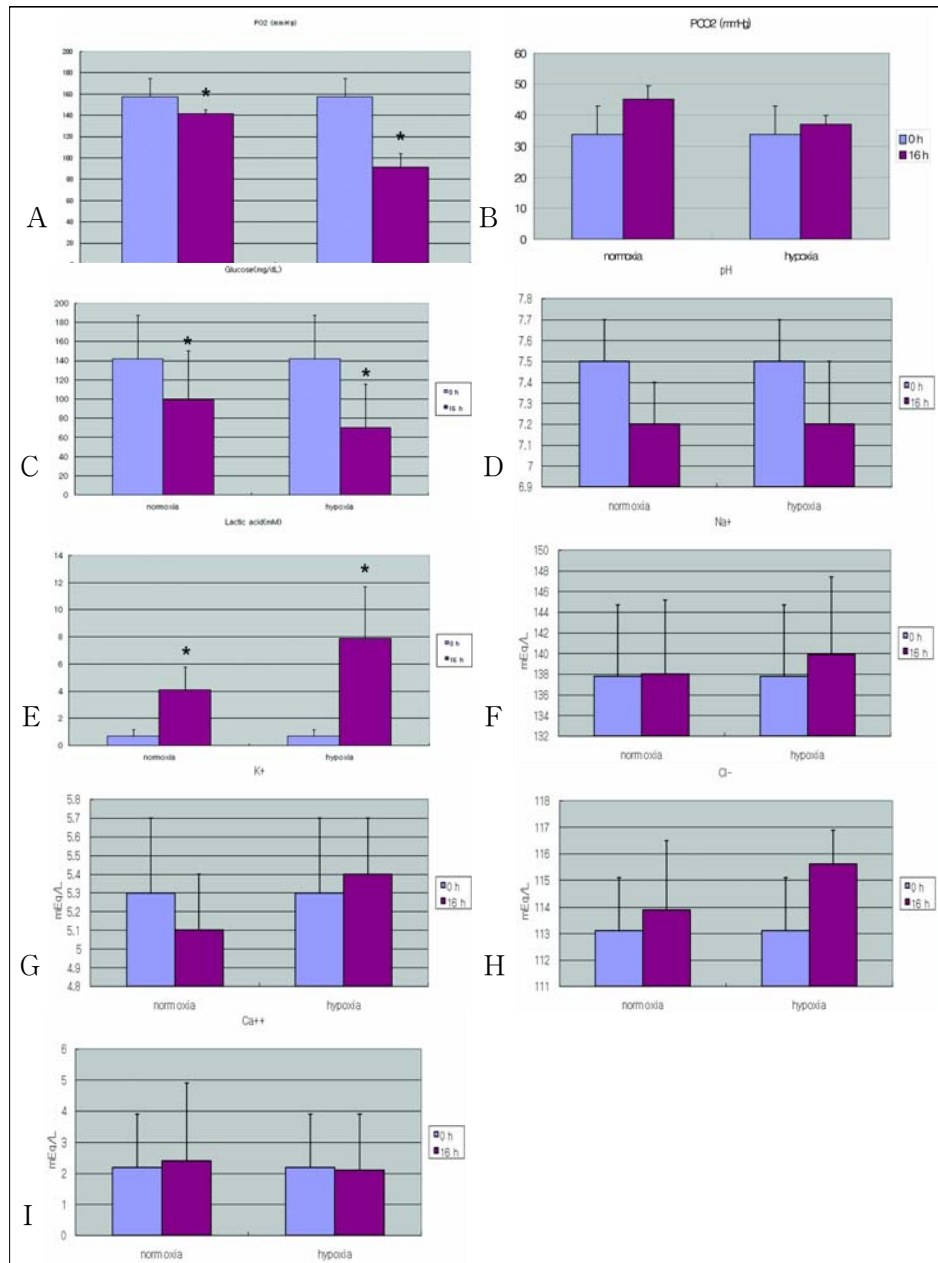
실험에 사용한 세포주는 비소세포폐암 세포주로서 A549 세포주(CCL-185TM, American Type Cell Culture, Manassas, VA)를 이용하여 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich, Seoul, Korea) 또는 RPMI-1640 배지(Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)에서 우태아혈청(Sigma-Aldrich, Seoul, Korea)과 함께 배양하였으며, 세포의 밀도가 80-90%에 도달하였을 때 실험을 수행하였다. 5% CO<sub>2</sub>와 95% 대기가스가 공급되는 37℃ 세포배양기에서 자라는 세포주를 대조군으로 하였다. 저산소군을 만들기 위하여 산소의 농도를 줄이는 방법은 세포배양기 내에 다시 작은 세포 배양기인 MIC-101(Modular Incubator, Billups-Rothenberg Inc., Germany)을 넣는 방법을 적용하였다(Figure 1). MIC-101 내에 세포배양접시를 넣어 두고 5분 동안 5% CO<sub>2</sub>와 95% N<sub>2</sub>가 혼합되어 있는 가스를 투여하여 배양액 내 MIC-101 내 산소의 분압을 감소시켰다. 세 개의 세포 배양 접시를 5% CO<sub>2</sub> 세포



**Figure 1.** Equipments for treating different oxygen concentration in cell culture system. (A) Two 10-cm cell culture dishes are located within MIC-101 hypoxic microchamber. (B) MIC-101 hypoxic chamber with cell culture dishes is located within 5% CO<sub>2</sub> cell culture incubator.

배양기에 넣어 대조군으로 삼고 저산소군은 세 개의 세포배양접시를 MIC-101 챔버에 넣고 이를 다시 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에 넣어 실험을 수행하였다. 같은 실험을 5회 실시하여 통계 분석을 실시하였다. 무산소 가스를 반복적으로 투여하였을 때의 세포 배양액 내의 상태를 알아 보기 위한 실험으로서, 처음 5% CO<sub>2</sub>

를 5회 실시하여 통계 분석을 실시하였다. 무산소 가스를 반복적으로 투여하였을 때의 세포 배양액 내의 상태를 알아 보기 위한 실험으로서, 처음 5% CO<sub>2</sub>



**Figure 2.** Measurement of oxygen and carbon dioxide tension and microenvironmental components (\*p<0.05). (A) Partial pressure of O<sub>2</sub>; In sixteen hours after treatment of 5% CO<sub>2</sub>-95% N<sub>2</sub> gas mixture, O<sub>2</sub> was decreased. (B) Partial pressure of CO<sub>2</sub>; In sixteen hours after treatment of 5% CO<sub>2</sub>-95% N<sub>2</sub> gas mixture, CO<sub>2</sub> was not decreased in comparison to normoxic control. (C) Glucose concentration was decreased significantly after 16 hour -treatment of hypoxia in contrast to normoxia (control). (D) The pH in hypoxia was not different from normoxic control in 16 hours of experiments. (E) Lactic acid concentration was significantly further increasing in 16 hours of hypoxic condition than normoxia. (F-I) [Na<sup>+</sup>], [K<sup>+</sup>], [Cl<sup>-</sup>], [Ca<sup>2+</sup>] were not different between normoxia and hypoxia in 16 hours of experiments.

와 95% N<sub>2</sub>가 혼합되어 있는 가스를 5분간 투여한 후 MIC-101 챔버를 밀봉한 후 30분이 경과하였을 때 다시 5% CO<sub>2</sub>와 95% N<sub>2</sub>가 혼합되어 있는 가스를 5분간 MIC-101 챔버에 5분간 투여하였다(purging). 재산소화(reoxygenation)은 5% 산소와 95% 대기가 섞인 가스에 노출시켜 산소화시켰다. 세포주가 자라는 배양액의 산소, 이산화탄소, pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 락트산, 포도당, 전해질(Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>)의 농도를 혈액가스분석기 (ABL725 Blood-Gas Analyzer; Radiometer; Copenhagen, Denmark)를 이용하여 실험 시작 후 16시간째에 측정하였다. 세포의 증식능은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma]법을 이용하였으며 96-well 판에 well 당 5,000개의 세포를 심고 실험군 별로 여섯 well씩 만들었으며 well 내 세포의 밀도가 90% 정도가 되도록 자랐을 때, 우태아 혈청을 1% 되게 한 DMEM에서 하루 동안 키운 후 본 실험에 들어갔고 72시간 동안 세포 증식능을 분광법을 이용하여 O.D.(Optical Density)값을 측정하였다. 대조군과 실험군간의 평균의 비교는 T 검정을 이용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 16시간 동안의 산소 농도 감소 시 배양액 내 미세 환경의 변화(Figure 2)

#### (1) 산소 분압의 변화

대조군에서 실험 시작 직후(0시간) 산소의 분압은 157.6±17.3 mmHg이었고 16시간 후에는 141.4±4.1 mmHg이었다. 저산소군에서는 16시간 후에 91.4±12.9 mmHg이었다.

#### (2) 이산화탄소 분압의 변화

실험 시작 직후 이산화탄소의 분압은 33.7±9.1 mmHg이었으며, 16시간 후 대조군의 이산화탄소의 분압은 45.1±4.1 mmHg이었고 저산소군에서는 36.9±3.0 mmHg로 두 군 간에는 차이가 없었다.

#### (3) 젓산, 포도당, pH의 변화

실험 시작 직후 젓산의 농도는 0.7±0.5 mg/dL이었

고, 16시간에 대조군의 젓산 농도는 4.1±1.7 mg/dL인 반면, 저산소군의 젓산 농도는 7.9±3.8 mg/dL로 유의한 차이를 보였다(p=0.014).

실험 시작 직후 포도당의 농도는 141.9±45.6 mg/dL이었으며, 16시간째 대조군의 포도당 농도는 99.4±51.3 mg/dL이었고, 16시간째 저산소군의 배양액 내 포도당의 농도는 70.3±45.7 mg/dL으로 두 군 간에는 유의한 차이를 보였다(p=0.026). 염기 과잉(base excess)의 수준을 측정하였을 때, 실험 시작 직후에는 1.0±10.9 mEq/L이었는데 16시간째에는 대조군에서는 -6.3±12.3 mEq/L, 실험군에서는 -9.2±16.4 mEq/L로 측정되었다.

실험 시작 직후 pH는 7.5±0.2이었으며, 16시간 대조군과 저산소군의 pH는 7.2±0.2와 7.2±0.3이었다.

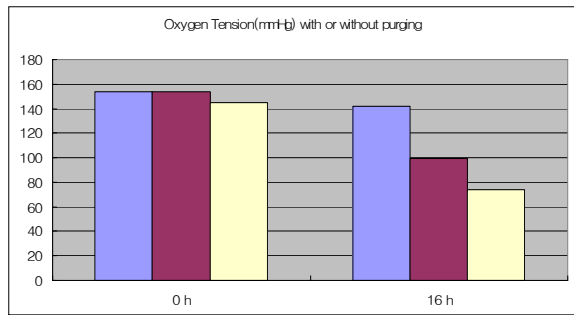
따라서, 대조군에 비해서 산소의 농도가 낮을수록 세포배양액 내에는 포도당의 농도는 더욱 감소하고 젓산은 축적되었다. 그러나 pH에는 차이가 나지 않는 것을 볼 수 있었다.

#### (4) 전해질의 변화

나트륨이온의 실험 시작 시점에서의 농도는 137.8±6.9 mEq/L이었으며, 16시간째에 대조군은 138.0±7.2 mEq/L, 저산소군은 139.9±7.5 mEq/L이었다. 칼륨의 이온의 경우, 실험 시작 시점에서의 농도는 5.3±0.4 mEq/L이었고, 16시간에는 대조군에서 5.1±0.3 mEq/L, 저산소군에서 5.4±0.4 mEq/L이었다. 염소이온은 실험시작 시점에서는 113.1±2.0 mEq/L이었고 16시간에는 대조군과 저산소군에서 각각 113.9±2.6 mEq/L, 115.6±1.3 mEq/L로 측정되었다. 칼슘이온의 경우, 실험 시작 시점에서 2.2±1.7 mEq/L이었고 16시간 후에는 대조군과 실험군에서 각각 2.4±2.1 mEq/L, 2.5±1.8 mEq/L로 나왔다. 따라서, 대조군과 저산소군에서 나트륨, 칼륨, 염소, 칼슘 이온의 시간에 따른 변화는 보이지 않았다.

### 2. 산소농도를 낮추거나 다시 올릴 때 세포 배양액 내 미세 환경의 변화(Hypoxia-reoxygenation) (Figure 3)

처음 배양액 내 산소의 분압이 148-150 mmHg이었던 것을 무산소 혼합 가스를 5분 동안 세정 및 정화하여 30분 후에 측정한 결과 74.5 mmHg 정도로 50%



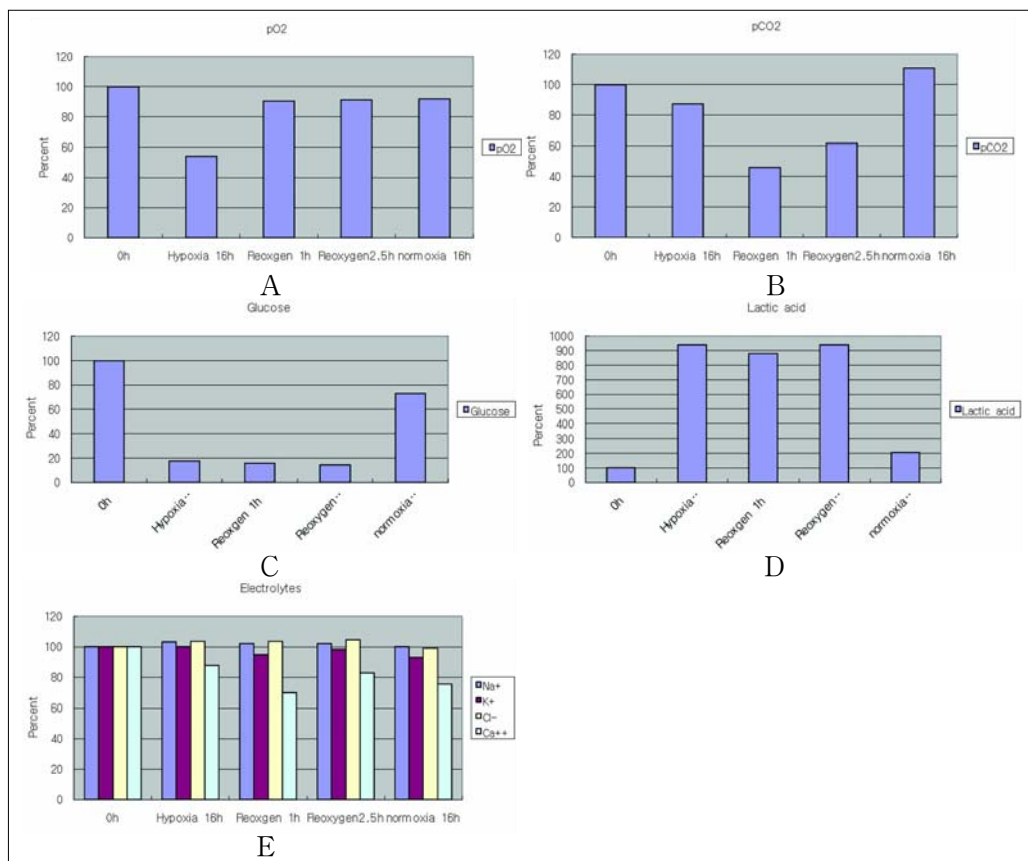
**Figure 3.** Change of partial fraction of oxygen resulted from purging anoxic gas into microchamber. After purging, partial pressure of oxygen was more decreased from oxygen concentration of hypoxic condition without purging. (First bar; normoxia, 2nd Bar; Hypoxia without purging, 3rd Bar; Hypoxia after purging)

가량 산소 분압이 감소시킨 뒤에, 5% 이산화탄소와 95%의 대기 가스를 다시 주입하고 한 시간에 측정한다.

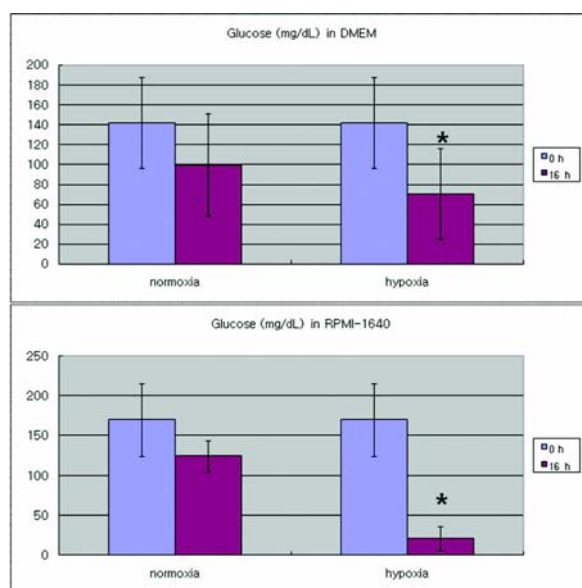
산소의 분압은 거의 처음의 상태로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 산소를 다시 투여하면 이산화탄소의 농도는 줄어들었다. 포도당, 젖산은 저산소 상태와 재산소화 상태에서 변화를 보이지 않았다. 나트륨, 칼륨, 염소, 칼슘 이온의 농도는 산소의 농도에 영향을 받지 않았다.

### 3. MIC-101에서 이산화탄소-질소 혼합가스를 정화(purging)하였을 때의 효과(Figure 4)

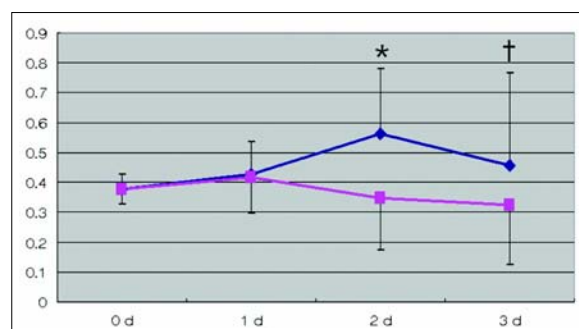
이산화탄소-질소 혼합 가스를 5분 가량 MIC-101에 투여한 후 30분 후에 다시 똑 같은 가스를 5분 가량 투여한 후 산소의 분압을 재었다. 혼합 가스를 사용하기 전에는 약 150 mmHg 정도였으며, 혼합 가스를 5분간 투여한 후에는 90.2 mmHg 정도였는데, 다시 한번 정화를 5분 동안 하면 74.1 mmHg로 산소의 농도가 더욱 떨어지는 것을 확인하였다.



**Figure 4.** Change of microenvironments in culture media during hypoxia-and-reoxygenation procedure. According to pre-hypoxic, post-hypoxic treatment and reoxygenation procedure, changes in partial pressure of O<sub>2</sub> (A), CO<sub>2</sub> (B), glucose (C) and lactic acid(D) were seen. Electrolytes were not changed significantly (E).



**Figure 5.** Differential effect on glucose level according to types of cell culture media (DMEM, RPMI) (\* $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Cell proliferation according to different oxygen concentration. In 48 hours, hypoxic cells proliferated more slowly than cells in normoxic condition. (—: Normoxia, ---: Hypoxia)

#### 4. 세포 배양액의 종류에 따른 미세 환경의 변화 (Figure 5)

DMEM으로 세포 배양하였을 때 포도당의 농도는 대조군과 저산소군 사이에 차이를 보이지 않았다. 반면, RPMI-1640 배지에서 세포주를 배양하였을 때, 0 시간에서 포도당 농도는  $170 \pm 45.6$  mg/dL이었고 16 시간째에는 대조군에서는  $124 \pm 20$  mg/dL인 반면, 저산소군에서는  $21 \pm 15$  mg/dL로 저산소군에서 포도당 농도가 현저히 감소하였다.

#### 5. 산소 농도 저하에 따른 비세포폐암세포주의 증식능력의 검사(Figure 6)

72시간 동안 세포의 증식능을 분광법을 이용한 O.D.값을 측정하였을 때, 대조군에 비해 저산소군의 세포는 48시간째부터 증식능력이 유의하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

### 고 찰

폐암 세포의 증식은 시간에 따라서 증식의 속도가 다르므로 시기에 따라 유전자의 발현이 다양하게 나타날 수 있다, 세포의 수가 늘어나고 종괴의 크기가 증가할 때 종괴는 중앙 혈관을 형성하여 생존과 증식을 이어간다. 그렇지만 중앙 혈관은 정상적인 혈관 형성과는 다른 형태와 기능을 가지고 있고 중앙의 중심부에 가까이 있는 세포는 외부 세포와는 다른 상대적인 저산소 상태에 있을 수 있다. 그 결과 중앙 내부는 괴사나 세포 자멸사 현상을 보일 수 있고 항암 화학약물이나 치료 방사선에 대해 감수성이 덜한 상태에 있을 수 있다. 그래서 중앙 내부 세포는 중앙의 재발이나 치료에 내성을 보이는 세포들로 남을 수 있다. 이러한 중앙 내부로부터 중앙 외부에 이르기까지 각각 다른 산소 농도에 노출되어 있는 암세포들의 생물학적 특성을 파악하기 위해서는 같은 종류의 암세포를 다양한 산소 농도에 노출시킨 뒤 그 결과를 살펴볼 필요가 있다. 저산소증에 의하여 세포에 비가역적인 세포 손상을 일으키는 기전으로 알려진 것으로는 세포의 에너지의 고갈, 세포의 산성화, 독성 대사 산물의 증가, 세포막 인지질의 파괴, 산소 유리기의 증가, 아데닌 뉴클레오타이드의 세포 내 소실 등을 들 수 있다<sup>14</sup>. 에너지의 고갈이 있을 경우, 이를 극복하기 위해서 세포는 해당 과정이나, 크레아티닌 키나아제 반응, 아데닐레이트 키나아제 반응의 활성화나 아데닌 뉴클레오타이드의 동화 과정이 작동되어 극복된다. 그리고 세포 내의 젖산은 세포 외로 배출이 촉진되는 기전도 활성화된다.

본 연구에서는 MIC-101이라는 작은 크기의 세포 배양기를 이용하였는데 이 기구로는 10 cm 지름의 세포 배양 접시를 6개 정도 넣을 수 있으며 세포 배양



접시의 종류에 따라 다양하게 세포를 키울 수 있다. 본 연구에서는 5분 정도의 무산소 혼합 가스를 MIC-101에 투여함으로써 150 mmHg의 산소 분압으로부터 90 또는 70 mmHg까지 산소 분압을 낮출 수 있었는데 무산소 혼합 가스를 초기 투여로부터 30분이 지난 뒤 다시 5분 정도 투여해 줌으로써 세포 배양액 내에 녹아 있던 산소가 MIC-101 내부로 확산되어 나오는 것을 다시 배출해 낸 효과로 생각이 되며, 무산소 혼합 가스로 정화(purging)하는 횟수에 따라서 세포 배양액 내 산소의 농도를 더 낮출 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 본 연구에서는 MIC-101으로 저산소-재산소(hypoxia-reoxygenation)의 모델에도 적용해 볼 수 있을 것으로 생각되며 MIC-101에 무산소 혼합가스 대신 산소가 든 가스를 교환 투여하면 되는 편리성을 확인할 수 있었다. 결국 산소의 분압을 달리 할 수 있고 재산소화를 시킬 수 있는데 유용한 실험법이 될 수 있을 것으로 기대해 본다.

세포 모델뿐만 아니라 실험 동물에서도 종양과 관련한 저산소증에 대한 실험이 몇몇 있는데 최근 기법으로 주목할 만한 것은 phosphorescence quenching 방법을 쥐 등 실험 동물에 적용하여 조직 또는 종양의 저산소 상태를 실시간으로 측정하는 방법이 있다<sup>15</sup>.

본 논문에서는 DMEM과 RPMI-1640을 이용하여 같은 실험을 해 보았는데, DMEM 배양액 내에는 25 mM(450 mg/dL)의 포도당이 포함되어 있는 반면, RPMI-1640 배지에는 11 mM(198 mg/dL)의 포도당이 포함되어 있다. 포도당의 세포 내 대사는 산소의 분압에 의존하게 되므로, 포도당의 농도 차이는 산소의 농도에 따라서 세포 내 대사 환경 또는 세포의 환경을 크게 변화시킬 수 있을 것이다. 암조직에 따라서 암세포의 대사 속도가 매우 다양하고 종양의 표면과 중심부에 따라서도 혈관의 발달 여부와 함께 산소의 농도나 포도당의 농도가 큰 차이가 날 수 있으므로 종양의 생물학적 실험을 할 때에는 하고자 하는 목적에 맞추어 세포배양액을 선택하는 것이 좋을 것으로 보이며, 대사가 빠르거나 상대적으로 혈액의 공급이 높은 암세포에 대한 실험을 할 때에는 포도당의 농도가 높은 DMEM을, 그 반대의 실험을 위해서는 RPMI-1640과 같이 포도당의 농도가 낮은 배지를 선택하거

나 처음부터 포도당이 들어 있지 않는 배지를 사용하여 연구자가 포도당 농도를 조절하여 실험을 수행하는 것이 좋을 것으로 보인다. 본 연구에서도 저산소에 의한 직접적 세포 효과를 볼 수도 있었지만, 저산소증으로 인하여 세포의 혐기성 대사가 유도된 결과 젖산의 축적과 pH의 감소 및 다양한 농도의 저포도당증이 암세포에 영향을 줄 수 있다는 사실을 생각하고 실험을 수행하고 해석하여야 할 것으로 보인다. 물론 비소세포폐암의 종괴 내부의 암세포와 외부의 암세포가 받는 미세 환경이 다르며 본 실험에서와 유사하게 내부 세포에서는 저산소, 산성, 저혈당증 등이 있을 것으로 기대되기 때문에 본 실험에서 저산소와 함께 세포 배양액 내 미세 환경을 임상적으로 중요한 기준을 중심으로 측정한 것은 체외 실험이 체내 실험을 대체할 수 없는 한계에도 불구하고 임상 의사에게 호소할 수 있는 실험 모델이 될 수 있을 것으로 보인다. 저산소증에 의해서 해당 과정(glycolytic pathway)이 변하게 되는 것은 저산소증에 의해 활성화되는 Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )이 해당과정을 조절하는 역할이 있기 때문이며 활성화된 HIF-1 $\alpha$ 는 저산소증에 의한 비소세포폐암주의 세포자멸사를 촉진시킨다<sup>16</sup>.

비소세포폐암의 대표적인 돌연변이 유전자인 p53 또한 HIF-1 $\alpha$ 과 밀접한 관련이 있으면서 저산소증에 민감하게 반응하는 유전자의 하나로 알려져 있다<sup>17,18</sup>. 그러나, 이와는 반대로 또 다른 연구에 의하면 저산소증은 폐암 세포의 세포 자멸사를 억제하는 역할을 할 수도 있는 것으로 보고되었다<sup>19</sup>. 이러한 사실들을 보면, 저산소증은 여러 가지 현상에 상반되거나 다양한 영향을 미칠 수 있어 연구마다 본 연구와 같은 인자들을 반드시 함께 고려하는 것이 필요할 것으로 보인다.

저산소증은 ATP의 생성을 줄이고 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 펌프의 작용을 감소시켜 세포 내로의 칼륨 이온의 이동을 줄이고 세포 외로의 나트륨 이온을 축적시킬 수 있다. 기타 칼륨 통로, 전압 의존 칼슘 이온 통로나 ATP의존 세포막 칼슘 펌프, 칼슘-나트륨 교환 통로 등도 저산소증과 관련이 있다<sup>20,21</sup>. 본 연구에서는 전해질의 세포막 이동이나 이온 통로에 대한 구체적인 연구를 시행하지 않아서 전해질의 이동에 대한 결정적인 연구

는 되지 못하는 한계가 있지만, 저산소증이나 정상 분압의 산소 환경 하 세포배양액 내 나트륨, 칼륨, 염소, 칼슘 이온의 농도의 큰 차이는 볼 수 없었다.

산소의 분압이 저하된 상태에서는 당연히기도 비소세포폐암 세포주의 증식은 억제 되는 것을 본 실험에서 관찰할 수 있었으며, 저산소에 의한 직접적, 간접적 효과에 의할 것으로 생각되며 본 논문에서는 제시되지 않았지만 재산소화 이후 세포의 증식능의 회복 등을 확인한다면 세포 생물학적 분자 생물학적으로 비소세포폐암세포의 성질이나 변화를 규명하는데 쉬운 길이 될 것으로 믿는다. 단 증식의 억제는 생존능이나 주변 조직 침입 능력이나 원격 전이 등과 같은 현상들과의 상관관계에 대해서는 앞으로의 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

결론적으로 본 연구를 통하여 저자들은, 저산소 상태가 세포 배양액 내 포도당 농도의 감소, 젖산의 증가, pH의 감소 등 세포 배양 미세 환경을 변화시키며, 저산소는 미세 환경 변화와 함께 직접적으로 그리고 간접적으로 비소세포폐암의 증식능에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

**배경 및 목적:** 암세포는 빠른 증식 속도로 인하여 상대적인 저산소증에 노출되면서 비정상적인 종양 혈관을 형성하여 치명적인 병인을 형성한다. 저산소증에서의 암세포 내의 유전자 표현을 연구하는 것은 병인의 규명과 나아가 치료에 결정적인 단초를 제공할 수 있다. 이에 본 연구에서는 체외 배양한 비소세포폐암의 증식과 저산소증 상태에 대한 연구를 시행하였다.

**재료 및 방법:** 비소세포폐암주인 A549를 RPMI 배지에서 계대 배양하였다. 저산소 유사 상태는 Modular Incubator Chamber(MIC-101)을 이용하였고 5% 이산화탄소와 95% 질소 혼합 가스를 5분간 공급하여 저산소 상태를 만들었으며 세포 배양액을 채취하여 혈액가스분석기(Blood Gas Analyzer ABL 725)로 세포 배양 상태를 측정하였다. 대조군으로 5% CO<sub>2</sub>와 멸균한 대기 공기 95%가 혼합된 가스를 사용

하였다. 세포의 증식 상태는 MTT 방법을 실시하였다.

**결 과:** 1. MIC-101을 이용하였을 때, 무산소혼합 가스를 투여 후 30분에 50%의 산소 분압저하를 확인하였으며, 대기 가스에 의해 산소농도를 회복하는 것을 볼 수 있었다. 2. 무산소 혼합가스로 정화(purging)를 하면 산소의 분압을 더 낮출 수 있었다. 3. 저산소 상태에서 세포 배양액 내에는 pH 감소, 젖산 증가, 포도당의 감소와 같은 미세환경이 변하였다. 4. 세포배양액에 따라 저산소에 의해 유도되는 포도당 저하에 차이가 있었다. 5. 비소세포폐암주는 저산소에 의해 증식능이 억제되었다.

**결 론:** 저산소 상태는 세포 배양액 내 포도당 농도의 감소, 젖산의 증가, pH의 감소 등 세포 배양 미세 환경을 변화시키며, 비소세포폐암세포는 증식이 억제된다. 저산소는 미세 환경 변화와 함께 직접적으로 그리고 간접적으로 비소세포의 증식능에 영향을 미친다.

## 참 고 문 헌

1. O'Byrne KJ, Dalglish AG, Browning MJ, Steward WP, Harris AL. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000;36:151-69.
2. Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1999;59:5863-70.
3. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 1999;80:1697-707.
4. Rofstad EK, Mathiesen B, Henriksen K, Kindem K, Galappathi K. The tumor bed effect: increased metastatic dissemination from hypoxia-induced up-regulation of metastasis-promoting gene products. *Cancer Res* 2005;65:2387-96.
5. Buchler P, Reber HA, Lavey RS, Tomlinson J, Buchler MW, Friess H, et al. Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *J Surg Res* 2004;120:295-303.
6. Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various



- human cancers. *BMC Genet* 2004;5:27.
7. Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, et al. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:776-84.
8. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Fezoulidis I. Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:545-53.
9. Swinson DE, O'Byrne KJ. Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006;7:250-6.
10. Swinson DE, Jones JL, Cox G, Richardson D, Harris AL, O'Byrne KJ. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int J Cancer* 2004;111:43-50.
11. Wang T, Niki T, Goto A, Ota S, Morikawa T, Nakamura Y, et al. Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma cell line A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Cancer Sci* 2007;98:506-11.
12. Koshikawa N, Takenaga K, Tagawa M, Sakiyama S. Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:2936-41.
13. Li L, Yu J, Xing L, Ma K, Zhu H, Guo H, et al. Serial hypoxia imaging with <sup>99m</sup>Tc-HL91 SPECT to predict radiotherapy response in nonsmall cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 2006;29:628-33.
14. Kobayashi S, Conforti L, Pun RY, Millhorn DE. Adenosine modulates hypoxia-induced responses in rat PC12 cells via the A2A receptor. *J Physiol* 1998;508(Pt 1):95-107.
15. Ziemer LS, Lee WM, Vinogradov SA, Sehgal C, Wilson DF. Oxygen distribution in murine tumors: characterization using oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *J Appl Physiol* 2005;98:1503-10.
16. Luo F, Liu X, Yan N, Li S, Cao G, Cheng Q, et al. Hypoxia-inducible transcription factor-1alpha promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway. *BMC Cancer* 2006;6:26.
17. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:22-36.
18. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1527-33.
19. Lee SM, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG. Hypoxia confers protection against apoptosis via PI3K/Akt and ERK pathways in lung cancer cells. *Cancer Lett* 2006;242:231-8.
20. Mairbaurl H, Wodopia R, Eckes S, Schulz S, Bartsch P. Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia. *Am J Physiol* 1997;273:L797-806.
21. O'Kelly I, Peers C, Kemp PJ. O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels in neuroepithelial body-derived small cell carcinoma cells of the human lung. *Am J Physiol* 1998;275:L709-16.