

저산소 조건에서 항암제와 니트로이미다졸 복합제제가 인간 간암 세포의 생존에 미치는 영향

대구가톨릭대학교 의과대학 ¹생화학교실, ²외과학교실, ³진단검사의학교실,
⁴병리학교실, ⁵안심내과, ⁶계명대학교 의과대학 생화학교실

임선하¹ · 이준엽⁵ · 박성환² · 김여희⁶ · 서헌석³ · 박재복⁴ · 이종원¹

Effect of Combination of Anticancer Agents and Nitroimidazoles on the Survival of Human Hepatocellular Carcinoma Cells under Hypoxic Conditions

Sun Ha Lim, M.S.¹, June Yeob Lee, M.D., Ph.D.⁵, Sung Hwan Park, M.D., Ph.D.², You Hee Kim, M.D.⁶, Hun Suk Suh, M.D., Ph.D.³, Jae Bok Park, M.D., Ph.D.⁴, Jongwon Lee, Ph.D.¹

Departments of ¹Biochemistry, ²Surgery, ³Laboratory Medicine, ⁴Pathology, College of Medicine, Catholic University of Daegu, ⁵AnsIm Internal Medicine Clinic, ⁶Department of Biochemistry, College of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Purpose: In a previous study, we have shown that anticancer agents inhibiting topoisomerases improve survival of tumor cells under hypoxic condition. In the present study, we evaluated whether and how cell survival effect of the anticancer agents under hypoxic conditions could be eliminated by the addition of nitroimidazoles, a class of bioreductive agents.

Methods: Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were incubated with different combinations of pimonidazole (1~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and doxorubicin (0.1 or 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) concentrations under different O₂ concentrations [1, 3, 5, 10 and 21 O₂]. Then cell numbers, glucose concentrations and lactic acid concentrations in the medium were measured, and DNA fragmentation assay was performed. Finally, different combinations of nitroimidazoles, such as pimonidazole, misonidazole, etanidazole, tinidazole, metronidazole, ornidazole or dimetridazole, and anticancer agents, such as doxorubicin, camptothecin, epirubicin, dactinomycin, etoposide or mitomycin C was added to the cell culture medium under hypoxic conditions (1% O₂).

Results: Pimonidazole at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eliminated cell survival effect of doxorubicin at the concentrations of 0.1 and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ under hypoxic condition (1% O₂) by promoting apoptosis. Almost all the cells died even after 24 hours of incubation for all the oxygen concentrations at a combination of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pimonidazole and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin. Finally, pimonidazole at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and misonidazole or etanidazole at a concentration of 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eliminated cell survival effect of all the anticancer agents tested under hypoxic condition.

Conclusion: Combination therapy of doxorubicin (adriamycin) with pimonidazole can maximize doxorubicin efficacy by eliminating cell survival effect of doxorubicin under hypoxic conditions in treating solid tumors, such as breast cancer. (J Korean Surg Soc 2009;76:337-347)

Key Words: Anticancer agent, Nitroimidazole, Hypoxia, Combination therapy, Apoptosis

중심 단어: 항암제, 니트로이미다졸, 저산소, 복합치료, 세포자살

책임저자: 이종원, 대구시 남구 대명4동 3056-6, ☎ 705-718, 대구가톨릭대학교 의과대학 생화학교실

Tel: 053-650-4471, Fax: 053-621-9206, E-mail: leejuw@cu.ac.kr

박성환, 대구시 남구 대명4동 3056-6, ☎ 705-718, 대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 053-650-4055, Fax: 053-621-9206, E-mail: shwpark@cu.ac.kr

접수일 : 2008년 10월 28일, 게재승인일 : 2009년 3월 5일

이 연구는 2002년도 대구가톨릭대학교 의과학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

서 론

암은 세포들이 정상적인 세포성장 기능을 잃어버리고 과잉으로 자라서 발생하기 때문에 기존에 사용되는 많은 항암제들은 빨리 성장하는 암세포를 죽이는 것을 목표로 한다. 하지만 이러한 항암제를 이용한 치료효과를 감소시키는 요인 중의 하나로 고형암에서 발생하는 저산소 지역이 있다. 우선, 고형암에서는 종양세포가 빠르게 자라면서 산소공급이 충분하지 못한 지역이 발생하게 되고,(1) 이를 해소하기 위해 혈관신생에 의해 새로운 혈관이 생성된다. 그런데 정상조직은 혈관이 균일하게 분포되어 있어 산소의 공급이 충분한데 반해 고형암 조직에서는 생성된 혈관의 분포가 불규칙하고 꾸불꾸불하거나 또는 일시적으로 혈관이 막혀 저산소 지역이 발생하게 된다.(2) 이렇게 저산소 지역이 발생하게 되면 종양세포의 성장이 느려지므로 성장하는 세포를 표적으로 하는 항암제의 치료효과가 줄어들거나,(3) 혈관으로부터 종양세포가 멀리 떨어져 항암제의 침투가 어려워지거나(4) 또는 이러한 열악한 조건에 적응한 더 강한 종양세포들이 살아남게 되므로(5) 방사선 요법, 화학요법 및 호르몬 요법을 어렵게 할 뿐만 아니라 전이도 촉진하여 그 치료를 더욱 어렵게 한다.(6,7) 고형암에서의 저산소지역이 항암제의 치료를 어렵게 하는 기존의 결과에 덧붙여 본 논문의 저자들은 위상이성질화효소 저해제(topoisomerase inhibitor)로 작용하는 항생제인 퀴놀론(quinolone)이 저산소와 저포도당 조건인 허혈조건에서 세포의 생존을 개선시키는 것을 발견하였으며,(8,9) 이를 근거로 동일한 기전에 의해 암을 치료하는 독소루비신(doxorubicin) 등 안트라사이클린(anthracycline) 계열의 항암제들도 허혈조건에서 세포자살을 억제하여 세포의 생존을 개선시키는 것을 확인하였다.(10) 이러한 결과는 독소루비신을 유방암 등 고형암의 치료에 적용할 경우 이에 대한 치료효과를 떨어뜨릴 수 있으므로 이를 해결할 필요성이 있게 되었다. 이를 위해서는 저산소 조건에서 특이적으로 세포에 대해 독성을 나타내는 생체환원성약물(bioreductive drug)이 그 후보가 될 수 있다.(11) 이 중의 하나로 저산소 조건에서 자유기를 생성함으로써 정상산소 상태에서는 세포에 대해 손상을 입히지 않는 반면에 저산소 상태에서는 세포를 죽이는 화학물질인 니트로이미다졸(nitroimidazole)이 있다.(12) 니트로이미다졸은 저산소 조건에서 환원효소에 의해 전자 하나씩을 받음으로써 독성을 나타내게 되는데 니트로이미다졸의 이

러한 성질을 고형암의 치료에 단독 또는 다른 항암제와 복합(13)으로 시도되었다.

본 연구에서는 독소루비신이 허혈조건에서 세포자살을 억제함으로써 세포생존을 개선시키는 효과를 다양한 니트로이미다졸 계열의 약제들이 줄일 수 있는지를 인간간암세포주를 이용하여 조사하였으며, 이로부터 독소루비신과 니트로이미다졸의 복합제제를 고형암의 치료에 사용할 수 있는 가능성에 대해 조사하였다.

방 법

1) 연구 대상

사람의 간암세포주인 HepG2 (ATCC HB 8065)세포는 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 10% 첨가된 최소필수배지(Minimum Essential Medium, MEM)(Gibco BRL, NY, USA)에서 배양되었다. 포도당 농도가 1 g/L인 배지는 2~3일에 한번씩 교체를 하였으며, 바닥 면적의 70~80%를 차지하였을 때 새로운 배양 접시로 옮겨주면서 계대 배양을 시행하였다. 항암제들이 저산소 조건에서 세포의 생존을 개선시키는 실험은 다음과 같이 시행되었다. 60 mm 배양 접시에 2.0×10^5 개의 HepG2 세포를 10% FBS가 첨가된 MEM 배지에서 2일 동안 37°C, 5% CO₂, 95% 대기 상태(정상 산소 조건)로 부착되도록 두었고, 그 이후에 새 배지로 교체한 다음 공기 내의 산소 농도를 조절할 수 있는 저산소 배양기(Vision Scientific Co. LTD., Seoul, Korea)를 이용하여 온도와 이산화탄소의 농도는 일정하게 유지하면서 실험 목적에 따라 산소 분압을 1% (저산소 조건)에서 21% (정상 산소조건)까지로 변화시키면서 실험을 시행하였다.

2) 연구 방법

(1) 실험 재료: 위상이성질화효소 저해 항암제로는 독소루비신(doxorubicin) (일동제약, Korea), 에피루비신(eporubicin) (일동제약, Korea), 에토포사이드(etoposide) (동아제약, Korea), 캄포테신(camptothecin) (Sigma, USA), 닥티노마이신(dactinomycin) (한국엠에스디, Korea)을 사용하였다. 또한 마이토마이신 C (mitomycin C) (한국유나이티드제약, Korea)도 사용하였다. 그리고 니트로이미다졸 계열로는 미소니다졸(misonidazole) (National Cancer Institute, USA), 피모니다졸(pimonidazole) (National Cancer Institute, USA), 메트로니다졸(metronidazole) (근화제약, Korea), 오르니다졸(ornidazole) (근화제약, Korea), 에타니다졸(etanidazole) (Sigma,

USA), 티니다졸(tinidazole) (Sigma, USA), 디메트리다졸(dimetridazole) (Sigma, USA)을 사용하였다. 이 때 투여된 각 항암제 들은 0.1, 0.5, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로, 니트로이미다졸 계열은 1, 10, 100, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 새로운 배지에 넣어 주고 각 산소 조건마다 세포의 생존이 어떻게 변화되는지 조사하였다.

(2) 세포 생존을 측정: 항암제 및 니트로이미다졸의 영향을 측정하기 위한 방법 중 하나인 세포의 생존을 측정은 트리판 블루 염색법(trypan blue exclusion)을 사용하였다. 이를 위해 배지를 제거한 후에 먼저 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 한 번 씻어내고 트립신(trypsin) 처리를 하였다. 세포를 포함하는 이 용액을 원심 분리를 하여 세포를 모은 다음 새로운 배지를 더해 세포 혼탁액을 만들었다. 그리고 0.4% 트리판 블루 용액(Gibco BRL, NY, USA)과 세포 혼탁액을 동량으로 섞어서 5분이 지난 뒤에 혈구계(hemocytometer)를 사용하여 살아 있는 세포의 수를 측정하였다. 이러한 세포 수의 측정은 동일 배양접시로부터는 2회를 측정하여 평균을 구하고, 이러한 것을 3개의 다른 배양접시에 대해 구한 다음 이 3개의 배양배지에 대한 세포수의 평균과 표준편차를 구하였다.

(3) 포도당과 젖산 농도의 측정: 세포의 대사 과정을 확인 하기 위하여 대표적인 에너지원인 포도당의 소비와 포도당 대사 산물인 젖산의 농도를 측정하였다. 저산소 상태나 정상 산소 상태에서 세포를 배양하고 일정 시간마다 샘플을 채취해서 각각의 경우에 포도당과 젖산의 농도를 측정하였다. 각 샘플들은 일정한 상태가 유지되는 전체 기간 동안 -70°C 에서 냉동 보관(Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA)되었다가 전체 샘플이 다 모여지면 분석을 실시하였다. 포도당은 hexokinase법을 이용하는 아산테크 GLU II 자동분석기용(Hitachi 747; Roche Diagnostics, Germany) 시액을 사용하여 농도를 측정하였고, 젖산의 농도는 LAC Slides (VITROS) (Ortho-Clinical Diagnostics Inc., USA)를 사용하여 Ektachem 750 (Rochester, NY, USA)로 측정하였다.

(4) DNA 분절 분석(DNA fragmentation assay): 배양 접시에 배양된 세포들로부터 배양액을 제거한 후 용해 완충액 [0.5% Triton buffer (Sigma Co., MO, USA), 5 mM Tris buffer (pH 7.4)(Boehringer Ingelheim, Germany), 20 mM EDTA (Sigma Co., MO, USA)]을 넣은 다음 생긴 용해질을 eppendorf tube에 모았다. 이것을 원심 분리하여 얻은 상등액을 protease K (Gibco BRL, NY, USA)로 처리한 후 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 용액을 이용하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 들어있는 DNA를 에탄올 침전법을 이용하여 얻은

후 1.5% 에가로즈 젤에 전기 영동을 실시하였다.

(5) 통계학적 분석: Window 용 SPSS (version 12.0) 프로그램을 이용하여 독립변수 t-test로 실시하였고 통계학적 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 정의하였다.

결 과

1) 피모니다졸 단독으로 세포의 생존에 미치는 영향

(1) 저산소 상태에서 피모니다졸이 세포의 생존에 미치는 영향: 독소루비신과 같이 저산소 상태에서 세포의 생존을 개선시키는 항암제의 효과를 니트로이미다졸 계열의 생체 환원성 약제들이 없앨 수 있는지를 조사하기에 앞서 피모니다졸 자체가 저산소 상태에서 세포의 생존에 미치는 영향을 먼저 조사하였다(Fig. 1). 저산소 상태에서는 피모니다졸의 첨가유무에 상관없이 모든 세포들이 배양 1일 후에 죽었다(Fig. 1A). 하지만 포도당의 소모와 젖산의 생성에 있어서는 그 차이를 나타내었다. 피모니다졸이 없는 경우에는 포도당이 모두 소모되면서 이것이 일부분이 젖산으로 되는 반면에 피모니다졸의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상인 경우에는 포도당의 소모는 감소하고 이에 따라 젖산의 생성도 감소하였다(Fig. 1B, C).

(2) 정상산소 조건에서 피모니다졸이 세포의 생존에 미치는 영향: 정상산소 조건에서 피모니다졸이 독성을 나타내는지 를 알아보기 위해 정상산소 조건에서 실험을 실시하였다 (Fig. 2). 정상산소 상태에서는 피모니다졸이 10 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포의 성장, 포도당의 소모 및 젖산의 생성 및 소모에 별 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다. 하지만 이 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 세포의 성장에는 별 영향을 미치지 않지만 포도당의 소모와 젖산의 생성에는 약간의 영향은 미치는 것으로 나타나고, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 세포들이 포도당의 소모나 젖산의 생성도 없이 완전히 죽었다. 이는 정상산소 상태에서 피모니다졸의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포에 독성을 크게 나타내지 않는 것을 의미한다. 이는 저산소 조건에서 피모니다졸을 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 넣어 독소루비신의 효과를 없앨 수 있으면 독소루비신의 부작용을 없앨 수 있다는 것을 나타내어, 독소루비신과 피모니다졸의 조합에서는 피모니다졸 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 이용하여 조사하였다.

2) 저산소 상태에서 피모니다졸이 독소루비신의 세포 생존 개선 효과를 없애는 정도와 그 작용기전의 조사

(1) 저산소 상태에서 피모니다졸이 독소루비신의 세포 생존

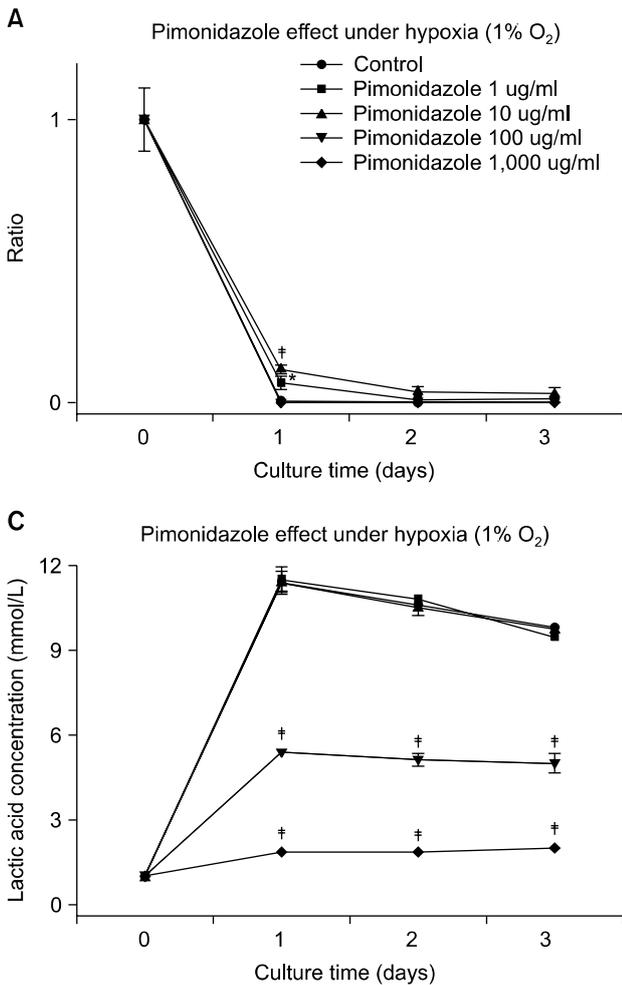


Fig. 1. Effect of pimonidazole concentrations on the cell viability under hypoxic conditions. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were grown in 4 ml of MEM culture medium at 2.5×10^5 cells/60 mm culture dish under normoxic condition for 48 hours before transferred to fresh culture medium with different pimonidazole concentrations under hypoxic conditions. Cell viability (A), glucose concentrations (B) and lactic acid concentrations in the medium (C) were measured during cell culture. The Y axis, Ratio, in (A) indicates the number of viable cells at a specific culture day divided by the number of viable cells at day zero. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run. †, ‡ and * represent $P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

개선 효과를 없애는 정도: 저산소 상태에서 독소루비신이 세포의 생존을 개선시키는 효과를 피모니다졸이 상쇄시킬 수 있는지를 조사하기 위해 피모니다졸 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 이미 선행 연구에서 허혈조건에서 세포의 생존을 개선시키는 것으로 밝혀진 독소루비신 0.1 및 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도(10)의 조합에 대해 실험을 실시하였다(Fig. 3). 이미 Fig. 2에서 보인 바와 같이 저산소 조건에서 아무 것도 첨가하지 않은 경우와 피모니다졸만을 첨가한 경우에는 24시간 만에 세포들이 모두 다 죽었다(Fig. 3A). 한편, 독소루비신만을 0.1과 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 경우에는 이미 보고한 바와 같이(10) 세포들의 생존을 개선시켰다. 반면에 여기에서 피모니다졸을 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 더 첨가한 경우에는 독소루비신이 세포생존을 개선시키는 효과를 피모니다졸이 없애어 최소한 배양 24시간 만에 세포들이 모두 죽었으며, (Fig. 3A) 이 때 포도당의 감소 정도와 젖산의 생성 정도는 피모니다졸만 투여한 경우와 유사하였다(Fig. 3B, C).

(2) 저산소 상태에서 피모니다졸이 독소루비신의 세포 생존

개선 효과를 없애는 기전: 피모니다졸이 저산소 상태에서 독소루비신의 효과를 없애는 기전을 알아보기 위해 DNA 분열분석을 실시하였다(Fig. 4). 저산소 상태에서 피모니다졸만을 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 넣은 경우에는 세포들이 세포자살에 의해 24시간까지만 나타나고 그 이후에는 세포들이 모두 죽어 DNA 사다리가 나타나지 않았다(Fig. 4A). 한편, 독소루비신에 피모니다졸을 첨가한 경우에도 예상된 바와 같이 피모니다졸만 넣은 경우와 동일한 경향을 나타내었다(Fig. 4B, C).

3) 정상산소 상태에서 피모니다졸이 독소루비신의 세포 생존개선 효과를 없애는 정도와 그 작용기전의 조사

선행연구로부터 정상산소 상태에서 독소루비신을 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 투여하면 세포의 생존을 억제하였으며 1 $\mu\text{g/ml}$ 투여하면 세포자살에 의해 세포의 사멸을 유도하였다.(10) 이 때 독소루비신으로 고형암을 치료할 때 피모니다졸을 첨가하면 피모니다졸이 독소루비신이 세포의 생존을 억제하는 효과를 상승적

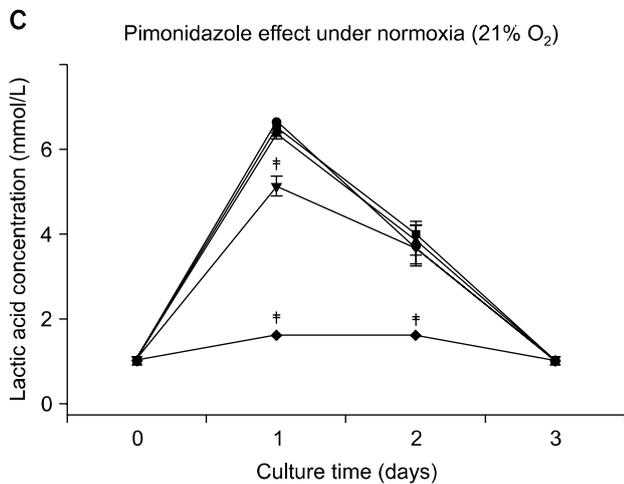
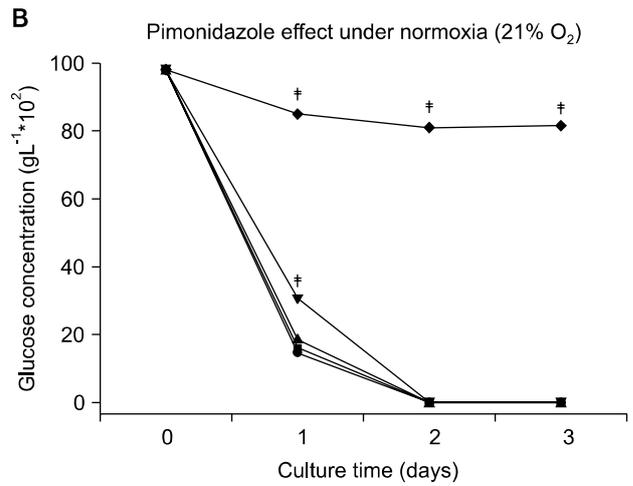
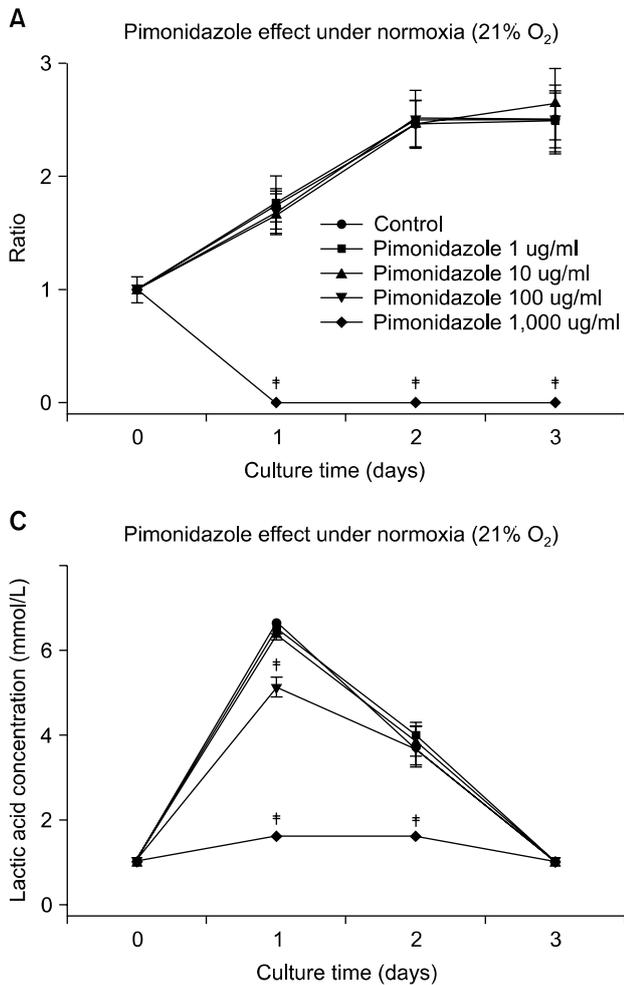


Fig. 2. Effect of pimonidazole concentrations on the cell viability under normoxic conditions. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were grown in 4 ml of MEM culture medium at 2.5×10^5 cells/60 mm culture dish under normoxic condition for 48 hours before transferred to fresh culture medium with different pimonidazole concentrations under normoxic conditions. Cell viability (A), glucose concentrations (B) and lactic acid concentrations in the medium (C) were measured during cell culture. The Y axis, Ratio, in (A) indicates the number of viable cells at a specific culture day divided by the number of viable cells at day zero. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run. †, † and * represent $P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

으로 증가시키는지를 조사하였다(Fig. 5). Fig. 1에서와 마찬가지로 정상산소 조건에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 피모니다졸 단독으로는 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 한편, 독소루비신 0.1 및 1 $\mu\text{g/ml}$ 에 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 피모니다졸을 추가로 첨가하여 복합적으로 투여하여도 그 생존능은 독소루비신만 첨가된 경우와 비교하여 별 차이가 없이 나타났다(Fig. 5A). 한편, 이러한 결과의 기전을 밝히기 위해 DNA 분절분석을 실시한 결과 Fig. 6에서 보는 것처럼 DNA 사다리가 나타나는 양상은 피모니다졸을 넣지 않고 독소루비신만 첨가하여 얻은 선행 연구결과(10)와 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다.

4) 산소농도에 따른 피모니다졸의 효과

이제까지의 결과에서는 정상산소 상태(21% 산소농도)에서는 독소루비신이, 저산소 상태(1% 산소농도)에서는 피모니다졸이 세포생존을 억제시키는 효과가 관찰되었다. 이러

한 산소농도에 따른 독소루비신과 피모니다졸이 미치는 영향을 조사하기 위해 1% 이외에 3, 5 및 10% 산소농도에서 독소루비신(0.1 및 1 $\mu\text{g/ml}$)과 피모니다졸(100 $\mu\text{g/ml}$)의 조합에 대해 실험을 하였다(Table 1). 독소루비신이 세포를 살리는 효과를 보면 독소루비신만 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 경우에는 산소농도가 3%까지는 대조군에 비해 세포를 살리는 효과가 더 강하게 나타나고, 10% 이상에서는 독소루비신이 세포를 죽이는 효과가 더 강하게 나타났다. 또한, 독소루비신만 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 경우에는 산소농도가 1%에서만 대조군에 비해 세포를 살리는 효과가 더 강하게 나타나고, 3% 이상에서는 죽이는 효과가 더 강하게 나타났다. 한편, 피모니다졸이 저산소 조건에서 세포를 죽이는 효과를 보면 피모니다졸만 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 경우에는 산소농도가 10% 이하에서는 세포를 죽이거나 생존을 억제하는 효과가 나타났으며, 산소농도가 21%에서만 대조군과 비슷하였다. 그리고 독소루비신과 피모니다졸을 혼합한 경우에 대해서는 독

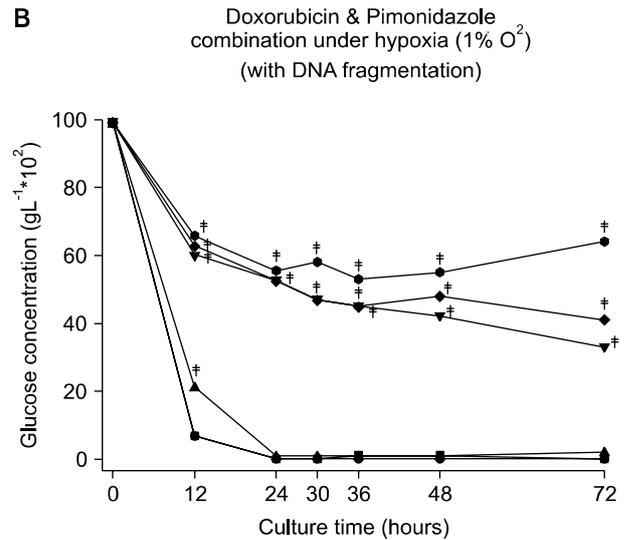
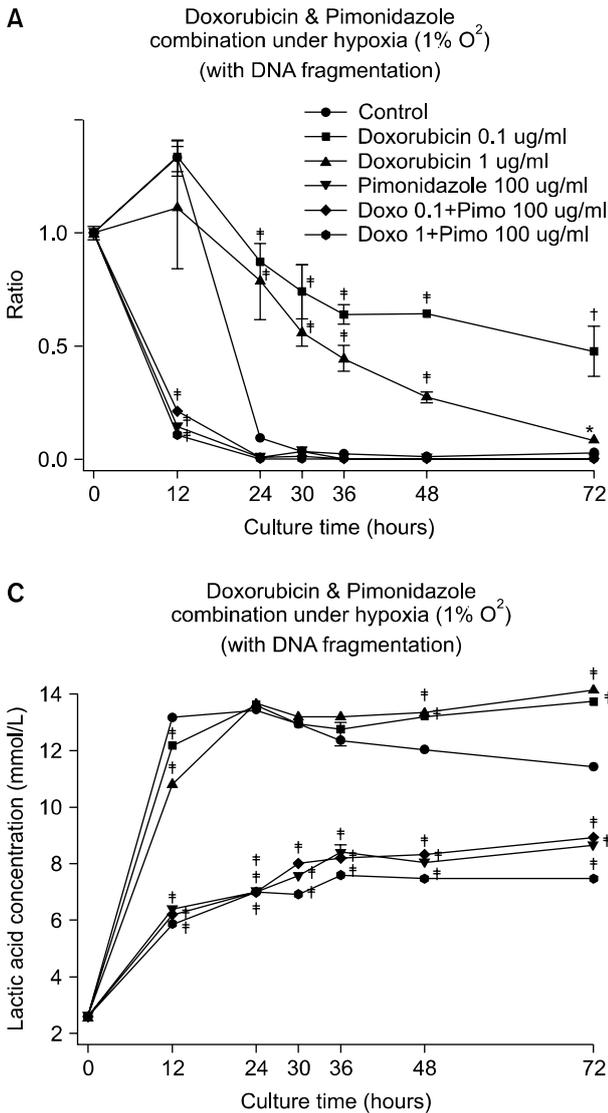


Fig. 3. Effect of pimonidazole concentrations on the cell viability in the presence of doxorubicin under hypoxic conditions. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were grown in 4 ml of MEM culture medium at 2.5×10^5 cells/60 mm culture dish under normoxic condition for 48 hours before transferred to fresh culture medium with different combinations of pimonidazole and doxorubicin concentrations under hypoxic conditions. Cell viability (A), glucose concentrations (B) and lactic acid concentrations in the medium (C) were measured during cell culture. The Y axis, Ratio, in (A) indicates the number of viable cells at a specific culture day divided by the number of viable cells at day zero. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run. †, † and * represent $P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

소루비신 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에 피모니다졸을 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 경우에는 산소농도 10%까지는 피모니다졸만 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 넣은 경향을 따르고, 21% 산소농도에서는 독소루비신만 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 로 넣은 경향을 따른다. 또한, 독소루비신 1 $\mu\text{g/ml}$ 에 피모니다졸을 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 경우에는 산소농도가 1%까지는 피모니다졸만 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 넣은 경향을, 산소농도가 5% 이상에서는 독소루비신만 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 넣은 경향을 따르고 산소농도가 3%에서는 독소루비신과 피모니다졸을 각각 따로 넣은 것보다 세포를 죽이는 효과가 더 강하게 나타났다. 한편, 피모니다졸을 항암제와 함께 투여한 경우에는 모든 산소농도에서 어떠한 약물을 투여하지 않은 대조군에 비해 세포를 죽이는 효과가 높게 나타났다. 그러나, 첨가된 독소루비신의 농도가 높을수록 세포를 죽이는 효과

가 더 낮은 산소농도까지 나타났다.

5) 니트로이미다졸들이 저산소 조건(1% 산소농도)에서 세포의 생존을 개선시키는 항암제들의 영향을 상쇄시키는 정도

피모니다졸 이외의 니트로이미다졸들인 미소니다졸, 에타니다졸, 티니다졸, 메트로니다졸, 오르니다졸 및 디메트리다졸이 저산소 조건(1% 산소농도)에서 세포의 생존을 개선시키는 항암제들인 위상이성질화 억제 항암제들인 독소루비신, 캄포테신, 에피루비신, 닥티노마이신 및 에토포사이드뿐만 아니라 미토마이신 C의 효과를 없앨 수 있는지를 조사하였다(Table 2). 이를 위해 각 항암제들의 농도는 저산소 조건에서 세포의 생존을 가장 잘 살리는 것으로 선행

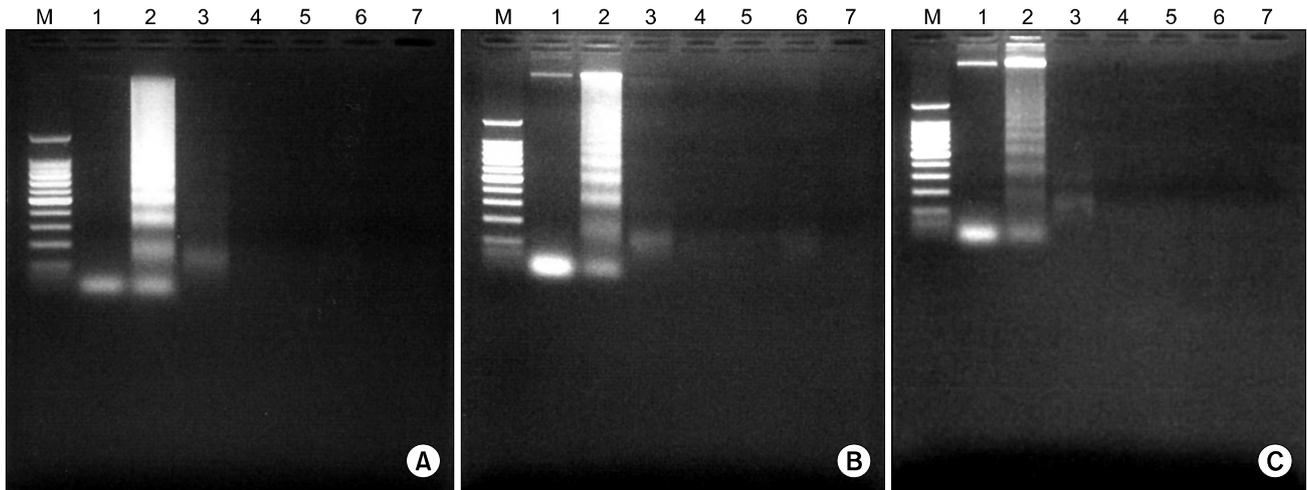


Fig. 4. Effect of pimonidazole on the DNA fragmentation in the presence of doxorubicin under hypoxic conditions. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were grown in 4 ml of MEM culture medium at 2.5×10^5 cells/60 mm culture dish under normoxic condition for 48 hours before transferred to fresh culture medium with 100 μ g/ml of pimonidazole in the presence of 0 (A), 0.1 (B) and 1 μ g/ml (C) doxorubicin concentrations under hypoxic conditions. At the indicated times, all the cells in the 60 mm dishes were lysed, and chromosomal DNA was taken and loaded to 1.5% agarose gel. Lane M (100 bp DNA marker), Lane 1 (0), Lane 2 (12), Lane 3 (24), Lane 4 (30), Lane 5 (36), Lane 6 (48), Lane 7 (72) hours of culture under normoxic condition).

연구에서 이미 밝혀진 농도로 하였으며, 각각 독소루비신은 0.1 μ g/ml, 캄포테신은 1 μ g/ml, 에피루비신은 0.5 μ g/ml, 닥티노마이신은 0.1 μ g/ml, 에토포사이드는 1 μ g/ml, 마이토마이신 C는 0.1 μ g/ml이었다. 피모니다졸은 독소루비신뿐만 아니라 생존을 개선시키는 다른 모든 항암제들에 대해서도 100 μ g/ml 농도로 24시간 만에 세포들을 모두 죽이는 효과를 나타내었다. 피모니다졸 이외에 미소니다졸과 에타니다졸도 효과를 나타내었으나 그 농도가 1,000 μ g/ml에서 나타났다. 이외의 니트로이미다졸 중에서는 오르니다졸이 1,000 μ g/ml 농도에서 독소루비신, 캄포테신 및 닥티노마이신 D에 대해서는 효과를 나타내었다. 이외의 니트로이미다졸은 효과가 없었다. 그리고, 특이하게도 닥티노마이신 D에 대해서는 모든 니트로이미다졸이 효과를 나타내었으며, 특히 혐기성 박테리아를 없애는데 사용되는 항생제인 메트로니다졸도 100 μ g/ml 농도에서 효과가 나타났다.

고 찰

기존에 사용되고 있는 많은 항암제들은 빨리 성장하는 암세포를 죽이는 것을 목표로 하고 있다. 본 연구자의 선행 연구에서 위상이성질화효소 저해제로 작용하는 항암제들 예를 들면 독소루비신, 에피루비신, 에토포사이드, 캄포테신, 닥티노마이신과 알킬화약물(alkylating agent)인 마이토마

이신 C (mitomycin C)가 0.1~100 μ g/ml 농도범위에서 허혈 조건에서 세포생존을 개선시키는 효과가 관찰되었다.(10) 특히 독소루비신은 정상산소농도에서는 농도의존적으로 간암 세포를 죽였으나, 저산소 조건(1% 대기 산소농도; 36 mmHg 산소분압)에서는 독소루비신의 농도가 0.1~10 μ g/ml 범위에서 오히려 세포자살을 억제함으로써 세포의 생존을 개선시키는 것이 관찰되었다. 실제로 정상조직의 산소분압이 평균 50~60 mmHg인데 반해 고형암 조직의 산소분압은 평균 10~20 mmHg 밖에 되지 않고,(2) 독소루비신으로 치료하는 경우 15~90 mg/m²의 농도로 일시주사를 하는 경우 초기 혈중 농도는 0.15~2.5 μ g/ml 농도 분포를 보이거나(14) 대개의 경우는 0.5~1.0 μ g/ml 범위 내에 존재한다.(15) 따라서 실제 치료에서 관찰된 조건(산소농도 10~20 mmHg, 독소루비신 혈중 농도 0.5~1.0 μ g/ml)은 본 연구의 세포배양에서 관찰된 독소루비신의 세포생존개선효과 조건(산소농도 36 mmHg, 배양조건에서의 독소루비신 농도 0.1~1.0 μ g/ml)과 일치하므로, 고형암의 치료에서 독소루비신이 저산소 조건하에 있는 종양세포를 살릴 가능성이 있다. 이러한 결과는 독소루비신이 고형암의 치료에서의 효능을 낮출 가능성이 있으므로 이를 없앨 수 있는 방법의 하나로 니트로이미다졸이 고려되었다.

니트로이미다졸은 원래 방사선요법으로 고형암을 치료할 때 저산소 지역에 존재하는 종양세포가 방사선요법에

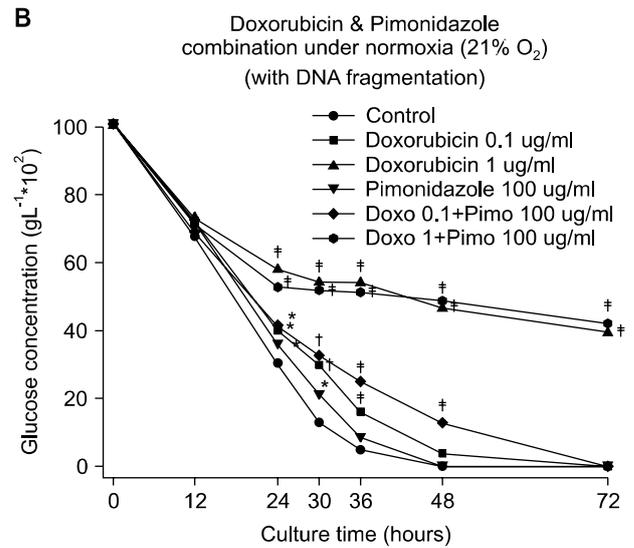
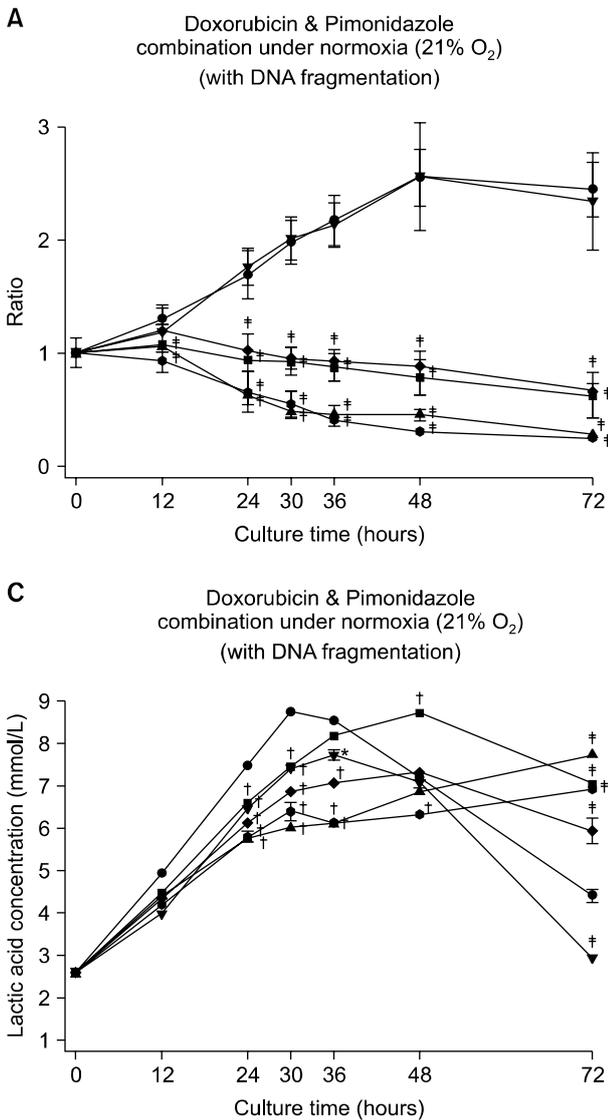


Fig. 5. Effect of pimonidazole concentrations on the cell viability in the presence of doxorubicin under normoxic conditions. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were grown in 4 ml of MEM culture medium at 2.5×10^5 cells/60 mm culture dish under normoxic condition for 48 hours before transferred to fresh culture medium with different combinations of pimonidazole and doxorubicin concentrations under normoxic conditions. Cell viability (A), glucose concentrations (B) and lactic acid concentrations in the medium (C) were measured during cell culture. The Y axis, Ratio, in (A) indicates the number of viable cells at a specific culture day divided by the number of viable cells at day zero. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run. †, ‡ and * represent $P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

저항성을 나타내는 것을 극복하기 위한 방사선민감제(radiosensitizer)로 개발되었다.(16) 본 연구에서 조사된 피모니다졸(17-19) 미소니다졸,(20,21) 에타니다졸,(22) 메트로니다졸(23)은 모두 방사선민감제로서의 가능성이 임상시험을 통해 조사되었다.

본 연구에서 피모니다졸은 정상산소 조건에서는 세포독성을 크게 나타내지는 않았지만(Fig. 1), 저산소조건에서 독소루비신이 세포자살을 억제함으로써 세포의 생존을 개선시키는 효과(8)를 없앨 만큼 강하게 세포자살을 촉진함으로써 세포를 사멸시키는 것이 확인되었다(Fig. 3, 4). 이러한 현상은 다른 니트로이미다졸의 하나인 INO2가 정상산소조건에서는 독성을 나타내지 않다가 저산소조건에서 세포자살을 촉진함으로써 세포사멸을 촉진하는 것(24)과, 또 다른

니트로이미다졸인 PR-000350이 저산소 조건에서 세포자살을 촉진함으로써 방사선이 나타내는 세포사멸 효과를 극대화시키는 것(25)에서 관찰되었다. 한편, 독소루비신은 정상산소조건에서 세포의 사멸을 촉진하므로,(8) 피모니다졸과 독소루비신을 복합으로 투여하면 낮은 산소농도에서는 피모니다졸이, 높은 산소농도에서는 독소루비신이 종양세포를 죽일 수 있게 되므로(Table 1), 복합치료로 모든 산소농도에서 종양세포를 없앨 수 있는 장점을 가지게 된다. 이러한 결과는 독소루비신을 이용한 고형암의 치료에서 피모니다졸을 투여하면 그 치료효과를 극대화시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

본 연구에서 저산소 조건에서 종양세포의 생존을 개선시키는 항암제들에 대해 가장 낮은 농도(100 μ g/ml)에서 이 항

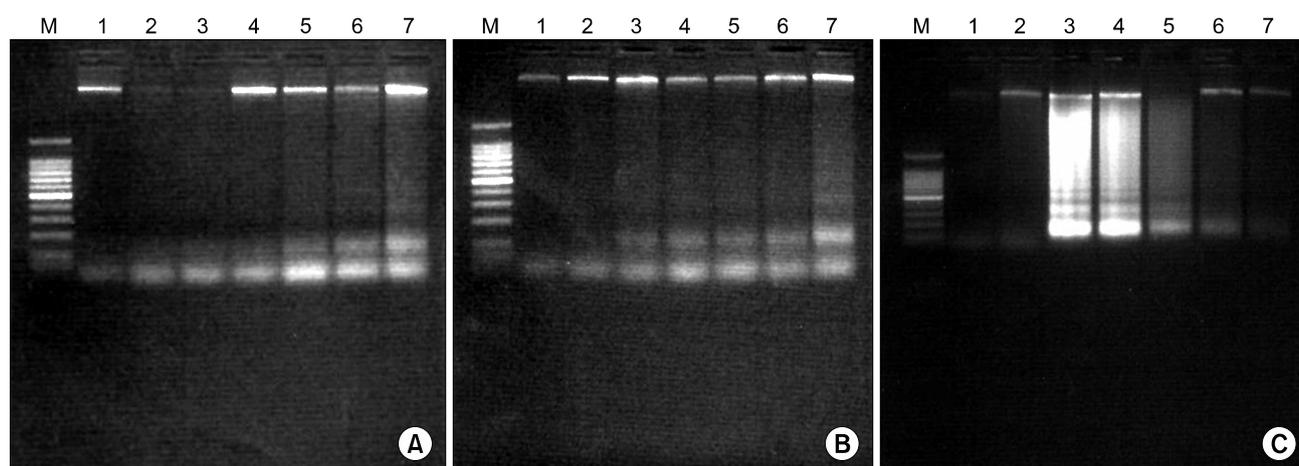


Fig. 6. Effect of pimonidazole on the DNA fragmentation in the presence of doxorubicin under normoxic conditions. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were grown in 4 ml of MEM culture medium at 2.5×10^5 cells/60 mm culture dish under normoxic condition for 48 hours before transferred to fresh culture medium with 100 $\mu\text{g/ml}$ of pimonidazole in the presence of 0 (A), 0.1 (B) and 1 $\mu\text{g/ml}$ (C) doxorubicin concentrations under normoxic conditions. At the indicated times, all the cells in the 60 mm dishes were lysed, and chromosomal DNA was taken and loaded to 1.5% agarose gel. Lane M (100 bp DNA marker), Lane 1 (0), Lane 2 (12), Lane 3 (24), Lane 4 (30), Lane 5 (36), Lane 6 (48), Lane 7 (72) hours of culture under normoxic condition.

Table 1. Effect of oxygen concentrations on the cell viability in the presence of different combinations of pimonidazole and doxorubicin concentrations

Oxygen concentrations	1%			3%			5%			10%			21%		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Incubation time (Days)															
Control	▽	×	×	●	●	▽	○	○	△	◎	○	△	◎	◎	○
Doxorubicin 0.1 $\mu\text{g/ml}$	○	●	△	●	●	●	○	○	△	●	●	△	●	●	△
Doxorubicin 1 $\mu\text{g/ml}$	△	△	▽	▽	▽	×	△	▽	×	△	▽	Almost ×	△	▽	Almost ×
Pimonidazole 100 $\mu\text{g/ml}$	×	×	×	△	▽	×	●	△	△	△	△	△	◎	◎	○
Doxorubicin 0.1 $\mu\text{g/ml}$ +Pimonidazole 100 $\mu\text{g/ml}$	×	×	×	△	▽	×	●	△	△	△	△	△	●	●	△
Doxorubicin 1 $\mu\text{g/ml}$ +Pimonidazole 100 $\mu\text{g/ml}$	×	×	×	×	×	×	△	▽	×	△	▽	×	△	▽	×

Qualitative conditions of cell viability are represented in the order of ◎, ○, ●, △, ▽ and ×, where ◎ and × are the best and the worst, respectively.

Table 2. Effect of nitroimidazoles on the cell viability in the presence of different anticancer agents

Anticancer agents	Doxorubicin* (0.1 $\mu\text{g/ml}$)	Camptothecin (1 $\mu\text{g/ml}$)	Epirubicin (0.5 $\mu\text{g/ml}$)	Dactinomycin D (0.1 $\mu\text{g/ml}$)	Etoposide (1 $\mu\text{g/ml}$)	Mitomycin C (0.1 $\mu\text{g/ml}$)
Nitroimidazole ($\mu\text{g/ml}$)						
Pimonidazole	100 [†] (24 hr [‡])	100 (24 hr)	100 (24 hr)	100	100 (24 hr)	100 (24 hr)
Misonidazole	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr) 10~100 (72 hr)	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr)
Etanidazole	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr) 10 (48~72 hr)	1,000 (24 hr)	1,000 (24 hr)
Tinidazole	No effect	No effect	No effect	10~1,000 (48~72 hr)	No experiment	No effect
Metronidazole	No effect	No effect	No effect	100 (24 hr)	No experiment	No effect
Ornidazole	1,000 (72 hr) 1/2	1,000 (72 hr)	No effect	100~1,000 (48~72 hr)	No experiment	No effect
Dimetridazole	No effect	No effect	No effect	100~1,000 (48~72 hr)	No experiment	No effect

*concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of anticancer agents where the agents showed improvement of cell viability the most under hypoxic conditions (1% oxygen concentration); [†]concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of nitroimidazole where improvement of cell viability by the respective anticancer agents was eliminated; [‡]numbers in the parenthesis of each column represent incubation time (hours) where the nitroimidazole effect occurs.

암제들의 이러한 부작용을 없앨 수 있는 피모니다졸은 임상시험에서 독성 때문에 단 회 투여에서는 $0.75\sim 1.0\text{ g/m}^2$ 농도 범위 내에서, 이것을 일주일에 3회씩 15회 투여하여도 안전하였으며, 이 때 중앙 내에서의 농도는 투여 30~40분 후에 $60\sim 70\text{ }\mu\text{g/ml}$ 이었다.(16,17) 키가 170 cm이고 몸무게가 68 kg인 사람으로 기준으로 하였을 때 그 표면적이 약 1.8 m^2 이므로,(26) 이를 고려하면 사람 1인당 독성을 나타내지 않는 $0.38\sim 0.5\text{ g/m}^2$ 농도로 피모니다졸을 투여하면 항암제가 세포의 생존을 개선시키는 부작용을 없앨 수 있는 농도인 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 를 얻을 수 있으므로 피모니다졸을 이용하여 임상시험을 실시할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 혹시라도 피모니다졸 단독으로는 효능이 낮게 관찰되면 다른 니트로이미다졸과의 복합치료도 고려해 볼 수 있을 것이다. 실제로 방사선을 이용한 치료에서 독성으로 인해 피모니다졸을 투여할 수 있는 농도에 한계가 있으므로 이를 극복하기 위해 그 작용기전이 다른 니트로이미다졸인 에타니다졸과의 복합으로 치료가 시도되었다.(27,28)

결 론

본 연구에서는 독소루비신을 포함한 위상이성질화효소 억제제인 항암제들이 저산소조건에서 종양세포의 생존을 개선시키는 부작용을 니트로이미다졸 그 중에서도 피모니다졸이 정상산소조건에서는 세포독성을 나타내지 않으면서 저산소조건에서는 독소루비신이 세포생존을 개선시키는 효과를 없애는 것을 확인하였다. 따라서 독소루비신을 이용한 간암과 같은 고형암의 치료시 피모니다졸과 같은 니트로이미다졸을 복합제제로 사용함으로써 치료효과를 높일 수 있을 것으로 사료된다. 특히 피모니다졸이 효능을 나타내는 농도범위가 실제 임상시험에서 독성을 나타내지 않는 농도범위에서 일어나 안전성이 어느 정도 확보되어 있으므로 복합치료의 효능을 임상시험을 통해 확인해 볼 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

피모니다졸(pimnidazole)과 미소니다졸(misonidazole)은 Drug Synthesis & Chemistry Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute의 Robert J. Schultz 박사로부터 제공받았음.

REFERENCES

- 1) Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007;85:1301-7.
- 2) Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004;9(Suppl 5):4-9.
- 3) Wouters A, Pauwels B, Lardon F, Vermorken JB. Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions. *Oncologist* 2007;12:690-712.
- 4) Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DS, Egorin MJ. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002;8:878-84.
- 5) Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:225-39.
- 6) Kizaka-Kondoh S, Inoue M, Harada H, Hiraoka M. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* 2003;94:1021-8.
- 7) Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:1093-101.
- 8) Lee YT, Han MJ, Lim SH, Park SH, Suh HS, Park JB, et al. Effect of antibiotics on the survival of human hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions. *J Korean Surg Soc* 2006;71:31-8.
- 9) Kim HS, Lee YM, Yoo MA, Lee JW, Ryu SH, Kim KW. Ofloxacin inhibits hypoxia/hypoglycemia-induced apoptosis in bovine aortic endothelial cells. *J Korean Assoc Cancer Prev* 2001;6:155-64.
- 10) Lee JY, Lim SH, Park SH, Ahn KS, Suh HS, Lee J. Effect of antitumor agents on the survival of human hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions. *Korean J Med* 2007;72:384-92.
- 11) Denny WA. The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *Lancet Oncol* 2000;1:25-9.
- 12) Tocher JH. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *Gen Pharmacol* 1997;28:485-7.
- 13) Teicher BA, Holden SA, al-Achi A, Herman TS. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the F5a11C murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 1990;50:3339-44.
- 14) Brenner DE, Galloway S, Cooper J, Noone R, Hande KR. Improved high-performance liquid chromatography assay of doxorubicin: detection of circulating aglycones in human plasma and comparison with thin-layer chromatography. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985;14:139-45.

- 15) Muller C, Chatelut E, Gualano V, De Forni M, Huguet F, Attal M, et al. Cellular pharmacokinetics of doxorubicin in patients with chronic lymphocytic leukemia: comparison of bolus administration and continuous infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32:379-84.
- 16) Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:397-417.
- 17) Roberts JT, Bleehen NM, Workman P, Walton MI. A phase I study of the hypoxic cell radiosensitizer Ro-03-8799. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984;10:1755-8.
- 18) Saunders MI, Anderson PJ, Bennett MH, Dische S, Minchinton A, Stratford MR, et al. The clinical testing of Ro 03-8799--pharmacokinetics, toxicology, tissue and tumor concentrations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984;10:1759-63.
- 19) A trial of Ro 03-8799 (pimonidazole) in carcinoma of the uterine cervix: an interim report from the Medical Research Council Working Party on advanced carcinoma of the cervix. *Radiother Oncol* 1993;26:93-103.
- 20) Grigsby PW, Winter K, Wasserman TH, Marcial V, Rotman M, Cooper J, et al. Irradiation with or without misonidazole for patients with stages IIIB and IVA carcinoma of the cervix: final results of RTOG 80-05. *Radiation Therapy Oncology Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:513-7.
- 21) Chan P, Milosevic M, Fyles A, Carson J, Pintilie M, Rauth M, et al. A phase III randomized study of misonidazole plus radiation vs. radiation alone for cervix cancer. *Radiother Oncol* 2004;70:295-9.
- 22) Drzymala RE, Wasserman TH, Won M, Shaw E, Cmelak AJ, Loeffler J, et al. A phase I-B trial of the radiosensitizer: etanidazole (SR-2508) with radiosurgery for the treatment of recurrent previously irradiated primary brain tumors or brain metastases (RTOG Study 95-02). *Radiother Oncol* 2008;87:89-92.
- 23) Urtasun R, Feldstein ML, Partington J, Tanasichuk H, Miller JD, Russell DB, et al. Radiation and nitroimidazoles in supratentorial high grade gliomas: a second clinical trial. *Br J Cancer* 1982;46:101-8.
- 24) Brezden CB, McClelland RA, Rauth AM. Mechanism of the selective hypoxic cytotoxicity of 1-methyl-2-nitroimidazole. *Biochem Pharmacol* 1994;48:361-70.
- 25) Kuno Y, Shinomiya N. PR-000350, a novel hypoxic radiosensitizer, enhances tumor cell killing by promoting apoptosis preferentially in the S-phase fraction. *Apoptosis* 2000;5:69-77.
- 26) Thomas CL. *Taber's Cyclopedic Medical Dictionary*. 17th ed. Philadelphia: F.A. Davis; 1993.
- 27) Newman HF, Ward R, Workman P, Bleehen NM. The multi-dose clinical tolerance and pharmacokinetics of the combined radiosensitizers, Ro 03-8799 (pimonidazole) and SR 2508 (etanidazole). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15:1073-83.
- 28) Bleehen NM, Newman HF, Maughan TS, Workman P. A multiple dose study of the combined radiosensitizers Ro 03-8799 (pimonidazole) and SR 2508 (etanidazole). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:1093-6.