

# 인체 폐암세포주에 대한 키토산의 항암효과와 항암제 감수성에 미치는 영향

노 숙 령 · 홍 정 연

중앙대학교 식품영양학과

## Antitumor Effect and the Change of Chemosensitivity of Chitosan in Human Lung Cancer Cell Line

Rho, Sook Nyung · Hong, Jeong Yeon

Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

### ABSTRACT

This study was designed to investigate the antitumor effect and the change chemosensitivity of chitosan in 2 kinds of humen lung cancer cell lines(NCI-H522, NCI-H596). To evaluate the antitumor effect and synergistic effect of chomosensitivity, MTT assay was used in vitro. Then anticancer drugs used were cis-platin, ectoposide, and adrimycin. The results of this study were as follows : Chitosan showed in antitumor effect on both NCI-H522 and NCI-H596. The lung cancer viability percent for NCI-H522 and NCI-H596 showed at the lowest levels of 5.31 and 5.33% when the concentration of chitosan was 25mg/ml media and the exposure time of chitosan was 72 hours. ID<sub>50</sub> value of chitosan on both NCI-H522 and NCI-H596 showed at the lowest levels of 14.07, 11.68mg/ml media when the exposure time of chitosan was 72 hours. The synergistic effect of chomosensitivity was better in NCI-H596 than in NCI-H522. When the synergistic effect of chomosensitivity was shown according to the kind of the anticancer drugs, in case of NCI-H522, in the concentration of 100µg/ml, ectoposide showed the highest synergistic effect of chomosensitivity and then was adrimycin In case of NCI-H596, in the concentration of 100µg/ml, the order of the synergistic effect of chomosensitivity was ectoposide>adrimycin> cis-platin and in the concentration of 10µg/ml, ectoposide> cis-platin>adrimycin. It is concluded that chitosan is an active antitumor agent and is increased chomosensitivity though there is difference according to the kind and the concentration of anticancer drugs. But to be used to lung cancer therapy, further studies on toxicity, the mechanism of action, animal experiment are wanted. (*Korean J Nutrition* 31(4) : 739~746, 1998)

**KEY WORDS** : chitosan · lung cancer · antitumor effect · synergistic effect · MTT assay.

### 서 론

Chitosan은 새우, 게등 갑각류의 껍질, 연체동물의 골격과 껍질 등의 구성성분인 chitin의 유도체로서  
채택일 : 1998년 3월 24일

chitin을 고온, 강알칼리로 처리하여 탈아세트화시킨 천연 고분자 물질로서 산업적으로 이용 가능한 양은 연간 약 200만억톤으로 추정되어 아직 충분히 활용하지 못하고 있는 천연자원으로서 주목되고 있다<sup>1)</sup>. 지금까지 연구된 chitosan의 활용범위를 보면 고분자의 응집제<sup>2)</sup>, 식품중간소재 및 기능성식품<sup>4,6)</sup>, 항콜레스테롤 및 항

암제<sup>7)8)</sup>로서 그 활용범위가 매우 넓다. 특히 chitosan은 면역 부활 효과를 지닌 다당체로서 항암효과가 있는 것으로 여러 연구결과에서 보고되고 있다. 즉, 류 등<sup>9)</sup>은 새우껍질에서 추출하여 만든 chitosan을 마우스에 이식한 sarcoma-180을 이용하여 in vivo와 in vitro에서 항암 효과 및 면역 기능에 미치는 영향을 실험한 결과 chitosan 0.04mg/g 투여시 고형암 성장 저지율을 보였으며 in vitro 상에서 세포의 독성작용은 거의 없었고 면역 활성을 증가시킨다고 보고하였다. 또한 鈴木 등<sup>10)</sup>의 연구 결과에서도 chitosan 0.05mg/g 투여시 월등한 종양 증식 억제 효과를 보였다고 한다. 암의 치료에 있어서 인체에 무해하고 효과적인 암을 퇴치할 수 있는 새로운 항암제의 개발이 현대의약의 당면과제라는 점을 고려할 때 불완전한 기존의 암치료에 병행하여 직접적인 세포독성보다는 면역활성을 이용하여 암을 치료하려는 것은 매우 의미있는 일이라 할 수 있다. 특히, 호흡기계에서 가장 중요한 암인 폐암은 대부분 진단이 늦어 수술 절제가 불가능한 경우가 압도적으로 많고 방사선요법이나 화학요법에 잘 반응하지 않아 완치가 거의 불가능한 실정이다<sup>11)</sup>.

현재까지 chitosan의 항암효과에 대한 논문들은 몇몇 있었지만 아직까지 폐암에 대한 효과에 관한 연구는 이루어지지 않은 실정이다. 이러한 시점에서 chitosan의 폐암세포주에 대한 항암효과 여부를 조사하는 것은 폐암치료에 있어서 매우 큰 의미가 있을 것이라 생각된다. 또한 폐암치료에 가장 많이 사용되고 있는 항암제인 cisplatin, ectoposide, adrimycin 등의 감수성에 chitosan이 미치는 영향을 조사함으로써 실질적으로 항암화학요법과 chitosan이 병용될 수 있는지를 조사하고자 한다.

따라서 본 연구에서는 게껍질로부터 추출한 chitin을 질산을 이용하여 분리시킨 가용성 chitosan의 항암효과를 알아보기 위해 in vitro에서 MTT assay를 통해 2종류의 인체 폐암세포주 NCI-H522, NCI-H596에 대한 chitosan의 항암효과를 조사하였고, 또한 항암제 cis-platin, ectoposide, adrimycin 등의 감수성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) Chitosan의 제조

실험에 사용된 가용성 chitosan은 Fig. 1과 같이 영덕계의 껍질로부터 분리한 chitin을 질산을 이용하여

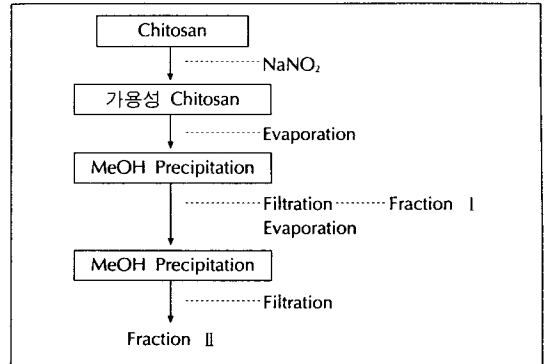


Fig. 1. Flow chart for the manufacture of water-soluble chitosan.

분리시켜 제조한 것이다. Fraction II를 사용하였다.

### 2) 암세포

암세포는 NCI-H522, NCI-H596 2개의 폐암 세포주를 중대 부속병원 중앙연구실에서 분양받은 것이다.

### 3) 재료 및 시약

암세포의 배양액은 RPMI 1640(Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc.) 조직배지에 fetal bovine serum(FBS, Gibco Laboratories, Life Technologies Inc.) 10%를 첨가하고 phenicillin과 streptomycin이 각각 10,000 U/ml와 10mg/ml 섞인 배양액을 사용하였다. Chitosan의 항암효과를 알아보기 위한 MTT Assay에는 MTT kit(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)를 사용하였다. 그리고 항암제로는 일동제약에서 제공받은 cisplatin과 보령제약에서 제공받은 ectoposide, adrimycin을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 시료의 조제

Chitosan을 RPMI-1640 배양액 1ml 당 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05mg/ml의 10가지 농도로 희석하여 시료로 하였다.

### 2) 세포배양

본 실험에서는 중대 부속병원 중앙연구실에서 분양받은 NCI-H522, NCI-H596 2개의 폐암 세포주를 사용하였다.

세포주들은 RPMI-1640 조직배지에 fetal bovine serum 10%를 첨가하고 phenicillin과 streptomycin이 각각 10,000 U/ml와 10mg/ml 섞인 배양액으로 tissue culture flask 25cm<sup>2</sup> style(T-25cm<sup>2</sup> flask; costar 3055), tissue culture flask 75cm<sup>2</sup> style(T-

75cm<sup>2</sup> flask : Costar 3375)을 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기(CO<sub>2</sub> culture incubator : Quene system, TM)에서 배양한다.

**3) 폐암세포에 대한 Chitosan의 항암효과에 관한 실험**

T-75 culture flask에 자란 모세포주를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고 trypsin-EDTA (Gibco BRL) 2ml을 첨가하여 세포를 분리시킨후 동량의 media를 첨가하여 중화시킨 후 1800 rpm에서 5분 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 이렇게 취한 세포를 96 well plate에 well당 10<sup>4</sup>개의 세포가 되도록 심고 24~48시간 배양한 후 10가지 농도의 chitosan이 첨가된 배지로 교환하여 24, 48, 72, 96 시간 동안 추가 배양하였다. 그런 후 시간에 따른 세포 생존률 비율(백분율)을 MTT assay로 측정하였다.<sup>12)13)</sup>

MTT assay는 MTT kit(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)를 사용하였는데 요약하면, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액을 각 세포주가 있는 well당 10μl씩 넣고 4시간동안 37℃ 세포배양기에서 배양시킨 후 solubilization solution(10% SDS in 0.01 M HCl)을 100μl씩 첨가하여 세포배양기에서 하루 밤새 배양시켰다. 그런 후 microplate 판독기(BIO-RAD Model 3550)로 590nm에서 흡광도를 측정하였다.

측정된 흡광도로부터 아래와 같이 생존한 세포의 비율을 구했다.

$$\text{Percent of viable cells(\%)} = \frac{\text{optical density with cytotoxic drug}}{\text{optical density without cytotoxic drug}} \times 100$$

**4) ID<sub>50</sub>(Inhibitory Dose 50) 값의 산출**

폐암 세포주에 대한 ID<sub>50</sub> 값은 Jandel Corps.의 Jandel Scientific Tablecurve, v 2.10 program으로 산출하였다.<sup>13)14)</sup>

**5) 폐암세포주에 대한 항암제 감수성의 평가**

모세포주를 96 well plate에 well당 10<sup>4</sup>개의 세포를 심고 24~48시간 배양한 후 cis-platin, ectoposide, adrimycin 등을 각각 최종농도가 100, 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>μg/ml로 첨가된 배지로 교환한 후 72시간 추가로 더 배양하였다. 이렇게 추가 배양한 후 세포생존율은 마찬가지로 MTT assay로 측정하였다.

**6) Chitosan이 항암제 감수성에 미치는 효과 측정**

ID<sub>50</sub>을 나타내는 chitosan의 농도를 계산하여 농도별로 첨가된 항암제와 같이 첨가하였다. 즉, 96 well plate에 모세포를 10<sup>4</sup>개 심은 후 24~48시간 배양한 후 chitosan과 농도별로 희석된 항암제가 첨가된 배지로 교환하여 추가로 72시간 더 배양하였다. 그런 후 세포 생존율은 마찬가지로 MTT assay로 측정하였다.

**3. 자료의 처리**

각 측정치는 3번 이상 측정된 암세포 생존률의 평균값과 표준오차로 표시하였고 chitosan의 양과 노출시간에 따른 암세포 생존률은 SPSS package를 이용하여 통계처리하였으며, 분산분석(ANOVA)으로 유의차를 검증하고, 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 각군간의 유의차를 검증하였다. 항암제만 첨가한 군과 chitosan과 항암제를 같이 첨가한 군과의 유의성 검증은 student t-test를 이용하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 폐암 세포주에 대한 chitosan의 항암효과**

폐암 세포주 NCI-H522, NCI-H596을 대상으로 chitosan을 10가지 농도로 처리하면서 배양시간을 각각 24, 48, 72, 96 시간으로 조정하여 본 결과는 Table 1, 2와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 NCI-H522세포주에서 chitosan의 항암효과는 chitosan의 양과 노출시간에 의존함을 관찰할 수 있었다.

모든 노출시간에 있어서 chitosan 25mg/ml media를 가하였을 경우 유의적으로 가장 낮은 암세포 생존률을 보여(p<0.001) 항암효과가 가장 크게 나타났으며, 대체로 chitosan의 농도가 낮아질수록 암세포 생존률이 증가하여 항암효과가 감소하는 경향을 보였다(p<0.001). Chitosan 노출시간에 따른 암세포 생존률을 비교한 결과 chitosan 25mg/ml media농도인 경우 24시간에서는 암세포 생존률이 20.66%였는데 48시간에서는 13.63%, 72시간에는 5.31%로 유의적으로 암세포 생존률이 감소하여 항암효과가 증가한 것으로 나타났으나 96시간 동안 노출시켰을 경우에 10.97%로 암세포 생존률이 오히려 유의하게 증가하여 항암효과가 감소함을 알 수 있었다(p<0.01). 이는 시간이 지남에 따라 생존한 암세포의 증식이 일어난 것으로 추정된다. Chitosan 12.5mg/ml media에서는 48시간과 72

Table 1. Lung cancer cell viability for NCI-H522 according to time of chitosan exposure (%)

Time of exposure (Hr)	Amounts of chitosan(mg/ml media)							F-value			
	25	12.5	6.25	3.13	1.57	0.79	0.40				
24	<sup>c</sup> 20.66 <sup>a</sup> ±1.37	<sup>c</sup> 60.86 <sup>b</sup> ±1.03	<sup>c</sup> 94.57 <sup>b</sup> ±2.07	<sup>c</sup> 99.61 <sup>c</sup> ±1.27	<sup>c</sup> 100.26 <sup>d</sup> ±0.51	<sup>c</sup> 98.42 <sup>c</sup> ±0.52	<sup>c</sup> 98.65 <sup>c</sup> ±1.43	<sup>a</sup> 93.96 <sup>b</sup> ±1.06	<sup>a</sup> 90.68 <sup>b</sup> ±0.80	<sup>a</sup> 91.86 <sup>b</sup> ±0.77	7.88***
48	<sup>b</sup> 13.63 <sup>a</sup> ±0.79	<sup>b</sup> 51.61 <sup>b</sup> ±0.59	<sup>b</sup> 89.23 <sup>c</sup> ±0.69	<sup>b</sup> 96.94 <sup>c</sup> ±1.29	<sup>b</sup> 108.74 <sup>c</sup> ±2.85	<sup>b</sup> 116.07 <sup>c</sup> ±6.66	<sup>b</sup> 103.87 <sup>d</sup> ±3.94	<sup>b</sup> 102.39 <sup>d</sup> ±5.06	<sup>b</sup> 109.71 <sup>c</sup> ±5.07	<sup>b</sup> 93.86 <sup>c</sup> ±1.08	89.12***
72	<sup>a</sup> 5.31 <sup>a</sup> ±0.71	<sup>a</sup> 50.56 <sup>b</sup> ±2.70	<sup>a</sup> 84.61 <sup>c</sup> ±5.69	<sup>a</sup> 105.00 <sup>d</sup> ±3.10	<sup>a</sup> 104.55 <sup>d</sup> ±5.26	<sup>a</sup> 105.33 <sup>d</sup> ±4.52	<sup>a</sup> 112.65 <sup>d</sup> ±5.45	<sup>a</sup> 104.59 <sup>d</sup> ±4.36	<sup>c</sup> 116.26 <sup>d</sup> ±0.18	<sup>c</sup> 94.14 <sup>c</sup> ±0.47	81.57***
96	<sup>b</sup> 10.97 <sup>a</sup> ±2.03	<sup>a</sup> 41.02 <sup>b</sup> ±4.96	<sup>a</sup> 76.78 <sup>c</sup> ±0.33	<sup>a</sup> 105.01 <sup>d</sup> ±3.09	<sup>a</sup> 111.88 <sup>d</sup> ±3.29	<sup>a</sup> 113.39 <sup>d</sup> ±0.59	<sup>a</sup> 114.18 <sup>d</sup> ±5.58	<sup>b</sup> 114.00 <sup>d</sup> ±1.13	<sup>c</sup> 116.66 <sup>d</sup> ±0.22	<sup>c</sup> 95.36 <sup>c</sup> ±1.28	18.37***
F-value	22.76**	7.91**	6.10*	2.91 <sup>NS</sup>	2.18 <sup>NS</sup>	3.93 <sup>NS</sup>	2.77 <sup>NS</sup>	4.63*	37.72***	2.34 <sup>NS</sup>	

N.S : Not Significant \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

Means with the same letter are not significantly different.

1) a,b means Duncan's multiple range test for the amounts of chitosan(row).

2) A,B means Duncan's multiple range test for the time of chitosan exposure(column).

Table 2. Lung cancer cell viability for NCI-H596 according to time of chitosan exposure (%)

Time of exposure (Hr)	Amounts of chitosan(mg/ml media)							F-value			
	25	12.5	6.25	3.13	1.57	0.79	0.40				
24	<sup>c</sup> 28.62 <sup>a</sup> ±0.86	<sup>c</sup> 75.41 <sup>b</sup> ±7.92	<sup>c</sup> 87.41 <sup>c</sup> ±1.48	<sup>c</sup> 75.53 <sup>b</sup> ±2.43	<sup>b</sup> 101.91 <sup>c</sup> ±7.93	<sup>b</sup> 95.65 <sup>d</sup> ±2.15	<sup>c</sup> 95.57 <sup>d</sup> ±2.19	<sup>a</sup> 95.52 <sup>d</sup> ±2.44	<sup>a</sup> 95.25 <sup>d</sup> ±0.99	<sup>a</sup> 96.11 <sup>d</sup> ±1.19	30.89***
48	<sup>a</sup> 7.01 <sup>a</sup> ±0.41	<sup>a</sup> 63.66 <sup>b</sup> ±4.54	<sup>a</sup> 74.99 <sup>c</sup> ±2.84	<sup>a</sup> 84.16 <sup>c</sup> ±1.63	<sup>a</sup> 83.48 <sup>c</sup> ±0.88	<sup>a</sup> 86.19 <sup>c</sup> ±3.05	<sup>a</sup> 86.00 <sup>d</sup> ±1.39	<sup>a</sup> 93.07 <sup>d</sup> ±1.19	<sup>a</sup> 95.19 <sup>c</sup> ±2.48	<sup>a</sup> 96.11 <sup>c</sup> ±2.03	113.85***
72	<sup>a</sup> 5.33 <sup>a</sup> ±0.41	<sup>a</sup> 57.77 <sup>b</sup> ±12.71	<sup>a</sup> 61.89 <sup>b</sup> ±4.49	<sup>a</sup> 64.01 <sup>b</sup> ±1.54	<sup>a</sup> 83.99 <sup>c</sup> ±1.20	<sup>a</sup> 86.10 <sup>c</sup> ±2.14	<sup>a</sup> 84.07 <sup>c</sup> ±2.11	<sup>a</sup> 83.32 <sup>c</sup> ±1.06	<sup>a</sup> 91.74 <sup>c</sup> ±5.13	<sup>a</sup> 93.38 <sup>d</sup> ±3.31	29.76***
96	<sup>b</sup> 10.27 <sup>a</sup> ±0.49	<sup>b</sup> 58.17 <sup>b</sup> ±2.23	<sup>b</sup> 70.81 <sup>c</sup> ±4.46	<sup>b</sup> 77.23 <sup>c</sup> ±7.59	<sup>b</sup> 83.22 <sup>c</sup> ±2.41	<sup>b</sup> 86.54 <sup>c</sup> ±1.61	<sup>b</sup> 92.36 <sup>d</sup> ±2.39	<sup>b</sup> 97.72 <sup>c</sup> ±1.17	<sup>b</sup> 87.92 <sup>c</sup> ±0.99	<sup>b</sup> 97.05 <sup>c</sup> ±2.06	65.81***
F-value	35.09***	1.08 <sup>NS</sup>	8.94**	3.99 <sup>NS</sup>	5.43*	4.37*	6.60*	17.12***	2.50 <sup>NS</sup>	0.57 <sup>NS</sup>	

N.S : Not Significant \*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

Means with the same letter are not significantly different.

1) a,b means Duncan's multiple range test for the amounts of chitosan(row).

2) A,B means Duncan's multiple range test for the time of chitosan exposure(column).

시간에 유의적으로 가장 낮은 암세포 생존률을 보여( $p < 0.01$ ) 항암효과가 가장 크게 나타났다. 6.25mg/ml media에서는 72시간에 유의적으로 가장 높은 암세포 생존률을 보여( $p < 0.05$ ) 항암효과가 가장 낮았다. 3.13 mg/ml media이하의 농도부터는 모든 노출시간에 있어서 암세포 생존률이 90%이상을 차지하므로 항암효과를 기대할 수 없었다.

즉, NCI-H522 세포주에서 chitosan은 단독으로도 충분한 항암효과를 나타냄을 알 수 있었는데 chitosan의 항암효과는 chitosan의 양과 노출시간에 의존적이었다. 본 실험을 통하여 항암효과가 가장 큰 chitosan의 농도는 25mg/ml media였고 노출시간은 72 시간이 가장 적절한 것으로 나타났다.

Table 2에서 보는 바와 같이 NCI-H596 세포주에서 chitosan의 항암효과를 조사해 본 결과 NCI-H522와 마찬가지로 chitosan의 항암효과는 chitosan의 양과 노출시간에 의존함을 관찰할 수 있었다.

24시간 노출시켰을 경우 chitosan의 양에 따른 암세포 생존률을 살펴보면 25, 12.5, 6.25mg/ml media 농도에서 각각 28.62, 75.41, 87.41%로 암세포 생존률이 유의적으로 증가하여 항암효과가 농도감소에 따라 감소하였다. 3.13mg/ml media에서는 75.53%로 다시 감소하다가 1.57mg/ml media이하의 농도에서는 암세포 생존률이 90%이상을 차지하여 항암효과가 나타나지 않았다( $p < 0.001$ ). 48시간에서는 25, 12.5, 6.25, 3.13mg/ml media 농도에서 각각 7.01, 63.66, 74.99, 84.16%로 암세포 생존률이 유의적으로 증가하였고 그 이하의 농도에서는 유의차가 없었다( $p < 0.001$ ). 72시간과 96시간 노출시에도 chitosan의 양이 증가할 수록 암세포 생존률이 낮아지는 경향을 나타냈다( $p < 0.001$ ).

Chitosan 노출시간에 따른 암세포 생존율을 비교한 결과 chitosan 25mg/ml media인 경우 24시간 동안 노출시켰을 때 암세포 생존율이 28.62%였는데 72시간에 5.33%로 감소하여 노출시간이 길어질수록 항암효과가 증가하였으나 96시간에는 오히려 10.27%로 항암효과가 감소함을 관찰할 수 있었다( $p < 0.001$ ). 12.5, 3.13, 0.1, 0.05mg/ml media의 농도에서는 시간에 따른 유의차가 없었다.

즉, NCI-H596 세포주에서도 chitosan은 단독으로도 충분한 항암력을 지님을 보여줬으며 이러한 항암력은 chitosan의 양과 노출시간에 의존적이었다. 본 실험을 통하여 항암효과가 가장 큰 chitosan의 농도는 25mg/ml media였으며 노출시간은 72시간이 가장 적절한 것으로 나타났다.

## 2. ID<sub>50</sub> 값의 산출

ID<sub>50</sub> 값은 시간별, 또 세포주간의 chitosan의 항암효과와의 비교와, 기존의 화학 항암제에 chitosan을 병용했을 때 항암제 감수성에 어떠한 영향을 미칠지를 알아보기 위해 산출하였다. 각 세포주의 ID<sub>50</sub> 값의 산출은 Jandel Scientific Tablecurve, v 2.10 program<sup>13)</sup>으로 하였다.

ID<sub>50</sub> 값을 산출한 결과 2가지 세포주에서 다같이 72시간 배양시에 ID<sub>50</sub> 값이 가장 낮아 72시간이 chitosan 노출시간으로 가장 적절한 것으로 나타났다. NCI-H522, NCI-H596에 대한 chitosan의 ID<sub>50</sub> 값은 각각 14.07, 11.68mg/ml로 NCI-H596이 NCI-H522보다 값이 더 낮게 나타나 chitosan에 대해 NCI-H596이 더 민감한 반응을 보임을 관찰할 수 있었다(Table 3). Chitosan과 항암제의 병용효과를 알아보기 위해서 첨가한 chitosan의 양은 가장 낮은 ID<sub>50</sub>값인 14.07, 11.68mg/ml을 각각 소숫점 둘째자리에서 반올림하여 NCI-H522에는 14mg/ml을 첨가하였고, NCI-H596에는 12mg/ml을 첨가하였다.

## 3. Chitosan이 항암제 감수성에 미치는 효과

폐암세포주에 대한 chitosan이 항암제 감수성에 미치는 효과를 조사해 본 결과는 Table 4, 5와 같다.

### 1) NCI-H522, NCI-H596 세포주에서 cis-platin에 대한 감수성의 비교

Table 4와 5에서 나타난 바와 같이 NCI-H522, NCI-H596 세포주에 각각 항암제 cis-platin을 가하였을 경우(대조군) 두 세포주 모두에서 cis-platin의 농도와 암세포 생존률은 용량 반응관계를 보였으며 농도가 높을수록 암세포 생존률이 낮아 항암효과가 증가함을 관찰할 수 있었다.

NCI-H522 세포주인 경우, cis-platin의 각 농도마다 chitosan의 ID<sub>50</sub>값인 14mg/ml media을 첨가한 군이 대조군과 비교하였을 때 cis-platin 100µg/ml 농도에서는 암세포 생존률이 유의하게 높아( $p < 0.05$ ) 오히려 cis-platin에 대한 항암제 감수성을 감소시켰으나,

**Table 3.** ID<sub>50</sub> values for lung cancer cell lines according to time of chitosan exposure (mg/ml media)

Time of exposure (Hr)	ID <sub>50</sub> of chitosan on lung cancer cell lines	
	NCI-H522	NCI-H596
24	16.57	18.60
48	15.05	13.38
72	14.07	11.68
96	14.14	13.17

**Table 4.** Lung cancer cell viability for NCI-H522 to anticancer drugs and chitosan(14mg/ml) (%)

Conc.of anticancer drug( $\mu$ g/ml)	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	1	10	100
Source						
cis-platin	<sup>1)</sup> 92.79 $\pm$ 6.02	88.35 $\pm$ 1.78	84.77 $\pm$ 2.88	78.91 $\pm$ 1.04	26.65 $\pm$ 2.09	10.68 $\pm$ 0.38
cis-platin +Chitosan	47.17 $\pm$ 4.10**	41.63 $\pm$ 3.65**	42.17 $\pm$ 1.62**	43.58 $\pm$ 0.88**	22.43 $\pm$ 2.69	13.41 $\pm$ 0.37*
Ectoposide	95.01 $\pm$ 4.44	90.52 $\pm$ 1.48	89.08 $\pm$ 1.53	71.02 $\pm$ 0.99	49.53 $\pm$ 1.25	49.60 $\pm$ 0.66
Ectoposide +Chitosan	54.78 $\pm$ 4.53**	51.10 $\pm$ 2.62**	53.97 $\pm$ 0.91**	49.52 $\pm$ 1.44**	49.65 $\pm$ 3.57	39.11 $\pm$ 2.21*
Adrimycin	91.49 $\pm$ 5.27	78.80 $\pm$ 3.27	73.44 $\pm$ 5.65	51.11 $\pm$ 6.47	36.01 $\pm$ 4.77	26.67 $\pm$ 1.75
Adrimycin +Chitosan	43.25 $\pm$ 0.85**	51.52 $\pm$ 0.89**	46.91 $\pm$ 2.40*	40.62 $\pm$ 0.69	30.33 $\pm$ 2.00	20.47 $\pm$ 0.45*

1) Mean $\pm$ S.E \*p<0.05 level \*\*p<0.01 level**Table 5.** Lung cancer cell viability for NCI-H596 to anticancer drugs and chitosan(12mg/ml) (%)

Conc.of anticancer drug( $\mu$ g/ml)	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	1	10	100
Source						
cis-platin	<sup>1)</sup> 98.04 $\pm$ 0.32	91.92 $\pm$ 1.13	85.80 $\pm$ 4.12	61.83 $\pm$ 5.60	44.23 $\pm$ 1.99	8.73 $\pm$ 0.68
cis-platin +Chitosan	47.63 $\pm$ 2.76**	47.55 $\pm$ 2.06**	41.94 $\pm$ 0.29**	42.57 $\pm$ 0.40*	16.44 $\pm$ 2.28**	3.70 $\pm$ 0.43*
Ectoposide	98.40 $\pm$ 0.88	95.79 $\pm$ 0.84	87.57 $\pm$ 1.47	65.63 $\pm$ 4.78	65.26 $\pm$ 2.34	51.87 $\pm$ 2.56
Ectoposide +Chitosan	51.95 $\pm$ 0.60**	46.92 $\pm$ 1.65**	36.19 $\pm$ 10.23**	48.96 $\pm$ 0.99**	15.03 $\pm$ 0.38**	15.44 $\pm$ 1.52***
Adrimycin	98.35 $\pm$ 5.51	86.72 $\pm$ 4.08	73.56 $\pm$ 0.39	54.35 $\pm$ 1.26	38.00 $\pm$ 4.65	19.96 $\pm$ 1.86
Adrimycin +Chitosan	52.67 $\pm$ 0.28**	45.74 $\pm$ 2.17**	45.82 $\pm$ 0.34**	46.67 $\pm$ 1.81*	13.76 $\pm$ 0.69**	11.13 $\pm$ 0.49*

1) Mean $\pm$ S.E \*p<0.05 level \*\*p<0.01 level

1 $\mu$ g/ml 이하의 농도에서는 암세포 생존률이 유의하게 낮았다(p<0.01). 그러나 1 $\mu$ g/ml의 농도 이하에서 chitosan을 첨가했을 때 50%정도의 암세포 생존률을 보인 것은 chitosan을 ID<sub>50</sub> 값으로 첨가한 것에 기인한 것으로 볼 수 있기 때문에 NCI-H522에서 chitosan과 cis-platin과의 병용효과를 기대하기는 어려울 것이다.

NCI-H596 세포주인 경우, cis-platin의 각 농도마다 ID<sub>50</sub> 값인 chitosan 12mg/ml media를 첨가한 군이 대조군과 비교했을 때 chitosan을 첨가한 군이 모든 농도에서 유의적으로 암세포 생존률이 낮았다(p<0.05). 따라서 NCI-H596 세포주에서 chitosan은 cis-platin의 감수성을 증가시킴을 관찰할 수 있었다.

## 2) NCI-H522, NCI-H596 세포주에서 ectoposide에 대한 감수성의 비교

Table 4와 5에서와 같이 NCI-H522, NCI-H596 세포주에 각각 항암제 ectoposide를 가하였을 경우(대조군) 두 세포주 모두에서 ectoposide의 농도와 암세포 생존률은 용량 반응관계를 보였으며 농도가 높을수록 암세포 생존률은 낮아 항암효과가 증가함을 관찰할 수

있었다.

NCI-H522 세포주인 경우, ectoposide의 각 농도마다 chitosan ID<sub>50</sub>값인 14mg/ml media를 첨가한 군이 대조군과 비교했을 때 ectoposide 100 $\mu$ g/ml 농도에서 암세포 생존률이 49.60%에서 39.11%로 10.49% 감소하여 항암효과가 유의하게 증가했음을 알 수 있었다(p<0.05). 10 $\mu$ g/ml 농도에서는 유의적 차가 없었으며 1 $\mu$ g/ml이하의 농도에서는 암세포 생존률이 유의하게 낮았으나 이때의 암세포 생존감소율이 50%정도를 나타내므로 1 $\mu$ g/ml이하의 농도에서는 chitosan과 병용효과를 기대할 수 없었다. 따라서 NCI-H522 세포주에서 chitosan은 ectoposide 100 $\mu$ g/ml농도하에서 ectoposide의 감수성을 증가시킴을 관찰할 수 있었다.

NCI-H596 세포주인 경우, ectoposide의 각 농도마다 chitosan ID<sub>50</sub>값인 12mg/ml media를 첨가한 군이 대조군과 비교했을 때 ectoposide의 모든 농도에서 암세포 생존률이 유의하게 낮았으며(p<0.01). 100 $\mu$ g/ml에서 암세포 생존률이 51.87%에서 15.44%로 36.43% 감소하였고 10 $\mu$ g/ml에서는 암세포 생존률이 65.26%에서 15.03%로 50.23% 감소함으로써 chitosan이 ec-

toposide의 감수성을 크게 증가시킴을 알 수 있었다( $p < 0.01$ ).

### 3) NCI-H522, NCI-H596 세포주에서 adrimycin에 대한 감수성의 비교

Table 4와 5에서와 같이 NCI-H522, NCI-H596 세포주에 각각 항암제 adrimycin를 가하였을 경우(대조군) 두 세포주 모두에서 adrimycin의 농도와 암세포 생존률은 용량 반응관계를 보였으며 농도가 높을 수록 암세포 생존률이 낮아 항암효과가 증가함을 관찰할 수 있었다.

NCI-H522 세포주인 경우, adrimycine의 각 농도마다 chitosan ID<sub>50</sub> 값인 14mg/ml media을 첨가한 군이 대조군과 비교했을 때 adrimycin 100 $\mu$ g/ml에서 암세포 생존률이 26.67%에서 20.47%로 6.20% 감소하여 항암효과가 유의하게 증가했음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ). 10, 1 $\mu$ g/ml 농도에서는 유의적 차가 없었으며 10<sup>-1</sup> $\mu$ g/ml이하의 농도에서는 암세포 생존률은 유의하게 감소하였으나 adrimycin과 chitosan의 병용효과로 보기는 어려울 것이다. 따라서 NCI-H522 세포주에서 chitosan은 adrimycin 100 $\mu$ g/ml농도하에서 adrimycin의 감수성을 증가시킴을 관찰할 수 있었다.

NCI-H596 세포주인 경우 adrimycin의 각 농도마다 chitosan ID<sub>50</sub>값인 12mg/ml media을 첨가한 군이 대조군과 비교하였을 때 adrimycin의 모든 농도에서 유의하게 낮았으며 100, 10 $\mu$ g/ml 각각 8.83, 24.24%의 암세포 생존률을 보임으로써 chitosan이 adrimycin의 감수성을 유의하게 증가시킴을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ).

즉, chitosan의 항암제 감수성 상승효과는 폐암 세포주에 따라 다르게 나타나 NCI-H522보다는 NCI-H596에 더 민감하게 작용하였으며 각 항암제에 따른 chitosan의 효과는 항암제 농도에 따라 다르게 나타났다. NCI-H522인 경우에는 희석배수 100 $\mu$ g/ml에서 ectoposide가 10.49%의 암세포 생존감소율로 가장 크게 항암 상승효과를 보였다. 모든 항암제에 있어서 희석배수 10 $\mu$ g/ml에서는 chitosan이 항암제 감수성에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. NCI-H596의 경우에는 희석배수 100 $\mu$ g/ml에서 ectoposide가 36.43%의 암세포 생존감소율을 보였으며 adrimycin(8.83%), cis-platin(5.03%) 순으로 나타났고 희석배수 10 $\mu$ g/ml에서는 ectoposid가 50.23%의 암세포 생존감소율로 항암 상승효과가 가장 컸으며 cis-platin(27.79%), adrimycin(24.24%)의 순으로 나타났다.

## 요약 및 결론

본 연구에서는 계집질로부터 추출한 chitin을 질산을 이용하여 분리시킨 가용성 chitosan의 항암효과를 알아보기 위해 in vitro에서 MTT assay를 통해 2 종류의 폐암세포주 NCI-H522, NCI-H596에 대한 chitosan의 항암효과를 조사하였고, 또한 항암제 cis-platin, ectoposide, adrimycin 등의 감수성에 미치는 영향을 조사하였다.

그 결과를 요약하면 다음과 같다.

### 1) 폐암 세포주에 대한 chitosan의 항암효과

Chitosan은 폐암세포주 NCI-H522, NCI-H596 모두의 경우에 항암효과를 보였다. Chitosan의 항암효과는 chitosan의 양과 노출시간에 의존적이었으며 Media 1ml당 25mg을 투여한 후 72시간 배양시켰을 때 각각 5.31, 5.33%의 세포 생존률로 가장 큰 항암효과를 나타내었다.

### 2) 시간에 따른 ID<sub>50</sub>값의 변화

폐암세포주 NCI-H522, NCI-H596 모두의 경우 chitosan 투여한 후 72시간에서 각각 14.07, 11.68mg/ml media로 가장 낮은 ID<sub>50</sub> 값을 나타내었다.

### 3) Chitosan이 항암제 감수성에 미치는 효과

ID<sub>50</sub> 값의 chitosan을 항암제와 같이 NCI-H522, NCI-H596에 각각 투여했을 때 항암제 감수성 상승효과는 폐암 세포주 NCI-H522 보다는 NCI-H596이 더 민감하게 효과적으로 작용했으며 각 항암제에 따른 chitosan의 효과는 NCI-H522인 경우에 희석배수 100 $\mu$ g/ml에서 ectoposide가 10.49%( $p < 0.05$ )의 암세포 생존감소율을 보임으로써 가장 크게 상승 효과를 보였으며 adrimycin은 6.20%( $p < 0.05$ )의 암세포 생존감소율을 나타냈다. NCI-H596의 경우에 희석배수 100 $\mu$ g/ml에서 ectoposide(36.43%), adrimycin(8.83%), cis-platin(5.03%) 순으로 나타났고 희석배수 10 $\mu$ g/ml에서 ectoposide(50.23%), cis-platin(27.79%), adrimycin(24.24%)의 순으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해보면 chitosan은 단독투여만으로도 폐암 세포주 종류에 구별없이 상당한 항암효과를 나타냈다. 항암제 감수성에 있어서도 상승 효과를 지닌 것으로 나타났으나 항암제의 종류와 농도, 또 폐암 세포주에 따라서 감수성의 효과가 다소 차이가 있었다. 이러한 점을 고려해 볼 때 chitosan과 항암제를 병용할 시에는 세포주의 확인과 항암제의 종류와 농도 결정이

필요할 것이다. 그러나 chitosan이 폐암치료에 실제로 이용되기 위해서는 정상세포에 대한 세포독성작용, chitosan의 항암작용기전, 동물실험 등에 관한 후속 연구가 필요하다고 사료된다.

■ 감사의 글

본 연구는 1997년도 중앙대학교 연구지원처의 교내 학술 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과로서 이에 깊은 감사를 드립니다(This research was supported by grants from The Reserch Support Institution of Chung-Ang University).

Literature cited

- 1) Cha WS, Na JY, Lee DB. Production and Utilization of Chitin/Chitosan. *Biotechnology News* 2(4) : 307-314, 1995
- 2) Bough WA. Reduction of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. *J Food Sci* 40 : 297, 1975
- 3) No HK. Application of crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compound from seafood processing wastes. Ph. D. Thesis, Louisiana State University, U.S. A., 1987
- 4) Knorr D. Functinal properties of chitin and chitosan. *J Food Sci* 47 : 593, 1982
- 5) Knorr D. Use of chitinous polymers in food. *Food Tech* 38(1) : 85, 1984
- 6) Austin PR, Brine SJ, Castle JE. Chitin, new facets of research. *Science* 212(15) : 749, 1984
- 7) M Sugano, T Fujikawa, Y Hiratsuji, Y Hasegawa. Hypocholesterolemic Effect of Chitosan in Cholesterol-fed rats. *Nutr Pept Int* 18 : 531, 1978
- 8) M Sugano, T Fujikawa, Y Hiratsuji, K Nakashima, N Fukuda and Y Hasegawa. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr* 33 : 787-793, 1980
- 9) Ryu BH. Antitumor and immunologic activity of chitosan extracted from shell of shrimp. *J Korean Soc Food Nutr* 21(2) : 154-162, 1992
- 10) S Suzuki, Y okura, K Hashimoto, M Suzuki. In chitin and chitosan, Proceeding of the second international conference on chitin/chitosan, ed. by S Hirano and S Tokura. The Japeanese Society of chitin and chitosan, tottori Univ., Tottori : 210, 1982
- 11) Kim YW. Suppressor genes of lung cancer. *내과학회지* 115-127, 1996
- 12) BG Campling, J Pym, HM Baker, SPC Cole and YM Lam. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *J Cancer* 63 : 75-83, 1991
- 13) 백영훈. 각종 암세포주에 대한 백두옹 추출물의 항암효과 및 항암작용. 충남대학교 대학원 의학과 일반외과학전공 박사논문, 1995