

악성 골종양 세포주들에 대한 Taxol의 세포독성

영남대학교 의과대학 정형외과학교실, 생화학교실*

신덕섭 · 김세동 · 김건호 · 이종형 · 김성용* · 김정희*

- Abstract -

Cytotoxic Effect of Taxol on Malignant Bone Tumor Cell Lines

Duk-Seop Shin, M.D., Se-Dong Kim, M.D., Keon-Ho Kim, M.D.,
Jong-Hyung Lee, M.D., Seong-Yong Kim, M.D.*, Jung-Hye Kim, M.D.*

Departments of Orthopedic Surgery and Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University*

Taxol, the extract from the *Taxus brevifolia* which is a Pacific yew tree has aroused the interest of the tumor investigators since the 1960s. As well, it is shown to have broad antitumor activity in pre-clinical experimental models. Its action mechanism is an anti-microtubule effect by duplication of tubulin. The most impresssive antitumor activity of taxol has been observed in advanced ovarian cancer and metastatic breast cancer. The purpose of this study was to determine how taxol acts on malignant bone tumor cell lines, to compare its cytotoxic effect with those of other chemotherapeutic agents, and to ascertain the its combination effect with adriamycin.

Cell lines used in this study were G-292(osteosarcoma, human), SaOS-2(osteosarcoma, primary, human), and HT-1080(fibrosarcoma, human). Methotrexate, adriamycin, cisplatinum, ifosfamide and taxol were used as testing chemotherapeutic agents and their maximum test concentration were 500 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, and 600 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The media for cell culture was RPMI-1640 with 10% fetal bovine serum and gentamycin.

The results were as follows. The IC_{50} of methotrexate, ifosfamide, cisplatinum, adriamycin and Taxol in G-292 were $2.3 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, $8.0 \times 10^0 \mu\text{g/ml}$, $3.5 \times 10^0 \mu\text{g/ml}$, $9.8 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, $2.7 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ respectively, in SaOS-2 $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$, $1.5 \times 10^1 \mu\text{g/ml}$, $2.8 \times 10^0 \mu\text{g/ml}$, $9.9 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$,

*통신저자 : 신 덕 섭

대구시 남구 대명동 317-1
영남대학교 의과대학 정형외과학교실

* 본 논문은 1996년 영남대학교 학술연구 조성비의 지원으로 이루어 졌음.
* 본 논문의 요지는 제 41차 대한정형외과학회 추계학술대회에서 발표 하였음.

respectively, in HT-1080 $4.2 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{ml}$, $5.4 \times 10^1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $3.8 \times 10^0 \mu\text{g}/\text{ml}$, $5.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$, $1.1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. In conclusion, taxol had very potent cytotoxic effect on the malignant bone tumor cell lines with adriamycin, and was more potent than methotrexate, cisplatin and ifosfamide. There were synergistic antitumor effects on G-292 and SaOS-2 cell lines in combination test of taxol and adriamycin. From the above results, it would be estimated that taxol could be a new antitumor drug for the malignant bone tumors, providing measures against the side effects and followed by the clinical tests.

MESH : Paclitaxel; Bone-neoplasm,-drug-therapy; Cell lines

서 론

사지에 발생한 악성 골종양의 치료에서 획기적인 변화라면 과거 절단술을 시행하고도 생존기간이 짧았던 데 비해, 사지구제 수술을 하고도 높은 생존율을 기대할 수 있다는 것인데, 이는 수술 수기의 발달도 있었겠지만 항암 화학요법의 발달 덕분이라 하겠다^{17,18}. 악성 골종양의 항암 화학요법에 많이 쓰이는 약제로는 methotrexate, adriamycin, cisplatin, ifosfamide 등을 들 수 있다. 그러나 이러한 항암제들은 치료효과와 함께 심한 부작용을 가지고 있으며, 증가하는 약제내성이 문제가 되고 있어, 새로운 항암제의 개발이 요구되고 있다. 최근 *Taxus brevifolia*라는 주목의 껍질에서 추출한 천연물질인 taxotere (RP56976 ; NSC628503 ; N-debenzoyl-N-tert-butoxycarbonyl-10-deacetyl-taxol ; 이하 Taxol 이라함)는 1971년 Monroe Wall 과 M.C. Wani²⁰에 의해 처음 항암 효과가 있다는 것이 알려지게 되었다. Taxol은 세포의 미세소관에 작용하여 항암효과를 가지는데, 기존의 항미세소관 제재와는 달리 미세소관의 중합에 필요한 튜불린 (tubulin)의 최소농도를 낮춤으로써 튜불린의 중합을 촉진하여 안정되고 비기능적인 미세소관을 형성함으로써 세포독성을 일으킬 수 있는 약제로 알려졌다. 또한 Taxol은 세포의 성장에서 DNA의 합성을 억제하며 절편화를 초래하여 세포독성을 나타낼 수 있음이 밝혀졌다²¹. Taxol은 백혈병에 상당한 세포독성을 나타내는 것으로 알려졌고, 폐암, 악성 흑색종과 cisplatin 저항성 난소암에서 항암작용이 관찰되었다²². 현재 임상에서는 난소암과 유방암, 특히 유방암의 전이시에 유용하게 쓰이고 있다. 저자들은 이러한 Taxol이 악성 골종양의 치료에도 유용

할 것인지를 알아보기 위해서 악성 골종양 세포주들에 Taxol과 악성 골종양의 치료에 사용되고 있는 기존의 항암제들을 투여하여, 각각의 세포독성을 측정하여 서로 역가를 비교하고, 기존 항암제와 Taxol을 병용투여 하였을 때의 상호작용은 어떠한지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

실험에 사용한 악성 골종양 세포주는 한국 세포주 은행에서 분양 받은 G-292(osteosarcoma, human), SaOS-2(osteosarcoma, primary, human) 및 HT-1080(fibrosarcoma, human) 의 3가지 세포들을 사용하였다. 세포 배양상 특별한 조건을 요하는 세포주는 없었다.

2) 항암제

항암제로는 methotrexate(유한양행, 서울, 대한민국), adriamycin(일동제약, 서울, 대한민국), ifosfamide(부광약품, 서울, 대한민국), cisplatin(Bristol-Myers Squibb, Quebec, Canada) 과 taxol(Bristol-Myers Squibb, Quebec, Canada)을 사용하였다. 이들은 시판 주사용 제제를 기준으로, methotrexate는 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$, adriamycin은 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$, ifosfamide는 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$, cisplatin은 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 taxol은 $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 최고 실험 농도로 하였다. 최고실험 농도에서부터 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 으로 차례로 희석하여 6가지의 농도를 만들어 실험에 사용하였다. 세포독성을 강하게 나타내는 약물은 10^{-10} 까지 희석하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

세포 배양을 위한 배양액은 10%의 fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) 과 gentamycin (국제약품, 서울) 이 첨가된 RPMI-1640(Gibco, Glandisland, NY) 을 사용하였으며, 세포들을 배양액에 분주 후 5% CO₂, 37℃, 100% 습도의 배양기에서 배양하였다. 세포주들은 배양 flask의 바닥 표면에 흡착하여 단층을 이루면서 자랐다.

단층 배양세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후, 5% trypsin과 EDTA를 섞은 용액을 가하여 잘 흔들어 flask 바닥의 세포들을 분리하였다. 이때 편광 현미경으로 분리를 확인한 후 충분한 배양액(10ml) 을 섞어서 trypsin에 의한 세포 손상을 중화시키면서 세포현탁액을 500g 에서 5분간 원심분리를 시행한 후 상층액을 제거하였으며, 배양액을 다시 10ml 가하여 pipetting으로 혼합시켰다. Hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였으며 trypan blue염색 및 편광 현미경으로 세포생존도가 90% 이상임을 확인후 실험을 하였다.

2) 적정 세포수 결정

적정세포수 결정을 위해 충분한 세포수인 20만 개의 세포를 차례로 반으로 희석하여 9단계로 나눈 후 각각 4개의 well에 넣고 37℃의 5% CO₂ 배양기에서 4일간 배양하였다. 배양후 tetrazolium-base compound인 3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-di-phenyltetrazolium bromide(MTT) 용액 50 μl를 각각의 well에 가하고 다시 4시간 동안 37℃, 5% CO₂, 100% 습도의 배양기에서 배양한 후 상층 용액을 제거하여 MTT에 의해 형성된 결정만 남긴 다음 100% DMSO(dimethyl sulfoxide) 를 250 μl씩 각각의 well에 분주하여 잘 혼합한 후 microplate reader로 파장 540nm 에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도로 세포주의 성장곡선을 구하였다(Fig. 1). 항암제에 대한 세포 성장억제 검사를 위해 각 세포주에서 급격하게 세포수가 증가되는 점을 기준으로 적정 세포수를 산출하였다(Table 1).

3) 각 항암제에 의한 각 세포주의 성장억제 실험
각각의 항암제를 최고 농도에서 부터 10⁻¹, 10⁻²,

10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 배로, 6단계로 희석하였다. 이 중 강한 세포독성을 나타낸 adriamycin과 taxol은 10단계까지 희석하였다. 각 well의 제 1 column에는 PBS만 0.2ml, 제 2 column에는 정해진 수의 세포(적정세포수) 가 포함된 배양액 0.18ml 와 0.02ml의 PBS를 넣어 두 대조군으로 만들었고 제 3 column에서 제 8 column까지 나머지 6개의 column에는 일정수의 세포가 포함된 배양액 0.18ml 와 각각 다른 농도의 항암제가 0.02ml씩 들어 가도록 하였고, 각 column마다 동일 조건을 가진 4개의 well들을 만들었다. 4일간 배양 후 MTT검사법을 시행하여 각 농도에 따른 세포 성장 정도를 나타내는 흡광도를 측정하였다. Fractional absorbance는 test well의 흡광도를 control well의 흡광도로 나눈 백분율로 구하였다. 각 세포주에서 항암제의 IC₅₀은 용량반응곡선(dose response curve) 에서 fractional absorbance가 50%인 농도로서 log표에서 구하였다. 적정세포수 결정 실험 및 각 항암제의 성장억제 실험은 최소한 3번의 반복 실험으로 12회 실험의 평균 값을 취하였다.

4) Taxol과 adriamycin의 상호작용에 대한 실험
예비 실험에서 악성 골종양 세포주들에 대하여,

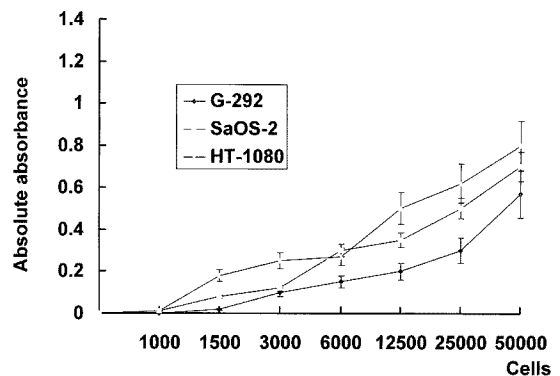


Fig. 1. Cell growth curve. The optimal cell numbers were chosen at the points of rapid growth.

Table 1. Malignant bone tumor cell lines used in this study

Cell line	Tumor type	cells/well
G-292	Osteosarcoma, primary, human	25,000
SaOS-2	Osteosarcoma, human	25,000
HT-1080	Fibrosarcoma, humann	10,000

taxol과 함께 가장 높은 세포 독성을 나타냈던 adriamycin 을 병용 투여 약물로 정하였다. 상호 작용을 보기위해 실험에 사용한 농도는 실험조작의 편의상 실제 IC₅₀(estimated IC₅₀) 와 유사한 농도(used IC₅₀)를 임의로 정하였다(Table 2). Taxol과 adriamycin은 각각 IC₅₀의 1배, 10⁻¹배, 10²배의 차레로 희석하고, 도표작성의 편의를 위해 상용 대수표에서 중간 값이 되는 3배, 3×10⁻¹배, 3×10⁻²배의 농도를 더 만들어 6단계의 농도와 항암제가 안들어간 0의 농도까지 7가지의 농도를 만들었다. 각각 다른 농도의 taxol 0.01ml를 넣은 96 well plate 7개에 각각 세포주마다 결정된 수의 세포를 넣었다. 여기에 adriamycin을 7가지 농도로 각각 0.01ml씩 들어 가도록 하여, 총 49가지 조합을 만들어 4일간 배양한 후 MTT 검사법을 시행하여 각 well의 fractional absorbance를 구하였다. MTT검사는 각 세포주에 대하여 3회 반복 시행하였고, 그 평균 값을 구하였다. 이상의 방법으로 fractional absorbance가 50%인 농도 즉, IC₅₀의 isobole을 구하였고 Tsai 등²³⁾이 고안한 방법인 isobologram을 이용한 기하학적 방법으로 판정하였다.

Table 2. IC₅₀ of adriamycin and taxol on human malignant bone tumor cell lines for combination test

Cell Line	IC ₅₀ (Estimated/Used), $\mu\text{g/ml}$	
	Adriamycin	Taxol
G-292	0.98/1.0	0.027/0.03
SaOS-2	0.099/0.1	0.0103/0.01
HT-1080	0.0055/0.006	0.0011/0.001

Table 3. IC₅₀ of anticancer drugs on human malignant tumor cell lines

Anticancer drugs	IC ₅₀ *		
	G-292	SaOS-2	HT-1080
Methotrexate	2.3×10 ⁻¹	3.5×10 ⁻¹	4.2×10 ⁻²
Ifosfamide	8.0×10 ⁰	1.5×10 ¹	5.4×10 ¹
Cisplatinum	3.5×10 ⁰	2.8×10 ⁰	3.8×10 ⁰
Adriamycin	9.8×10 ⁻¹	9.9×10 ⁻²	5.5×10 ⁻³
Taxol	2.7×10 ⁻²	1.0×10 ⁻²	1.1×10 ⁻³

IC₅₀ : 50 percentile inhibition concentration($\mu\text{g/ml}$)

결 과

1. 각 항암제에 대한 각 세포주들의 성장억제 실험

항암제의 역가를 비교하는 기준이 되는 IC₅₀값을 구한 결과, Taxol 은 G-292 세포주에서는 2.7×10⁻² $\mu\text{g/ml}$ 이었고, SaOS-2 세포주에서는 1.0×10⁻² $\mu\text{g/ml}$, HT-1080 세포주에서는 1.1×10⁻³ $\mu\text{g/ml}$ 이었다 (Fig. 2). methotrexate의 IC₅₀값은 G-292 세포주에서는 2.3×10⁻¹ $\mu\text{g/ml}$ 이었고, SaOS-2 세포주에서는 3.5×10⁻¹ $\mu\text{g/ml}$, HT-1080 세포주에서는 4.2×10⁻² $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Cisplatinum의 IC₅₀값은 G-292 세포주에서는 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 이었고 SaOS-2 세포주에서는 2.8 $\mu\text{g/ml}$ 였으며 HT-1080 세포주에서는 3.8 $\mu\text{g/ml}$ 였다. Ifosfamide의 IC₅₀은 G-292 세포주에서는 8.0 $\mu\text{g/ml}$ 였고 SaOS-2 세포주에서는 15 $\mu\text{g/ml}$ 였으며 HT-1080 세포주에서는 54 $\mu\text{g/ml}$ 였다. Adriamycin의 IC₅₀은 G-292 세포주에서는 9.8×10⁻¹ $\mu\text{g/ml}$ 이었고, SaOS-2 세포주에서는 9.9×10⁻² $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, HT-1080세포주에서는 5.5×10⁻³ $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Taxol은 adriamycin과 함께 모든 세포주에서 다른 항암제보다 높은 세포독성을 보였다 (Table 3).

2. Taxol과 adriamycin의 병용 투여에 대한 실험

Taxol과 adriamycin 각각의 농도를 조합하여 세포 생존정도를 백분율로 환산하여 Table 4, 5, 6에 표시하였다. 한가지 taxol 농도에 대한 adriamycin 농도에 따른 생존 검사에서 50% 생존시의 adriamycin의 농도를 IC₅₀ unit로 환산한다. 반대로 한가지 농도의 adriamycin 일때 taxol 의 50%

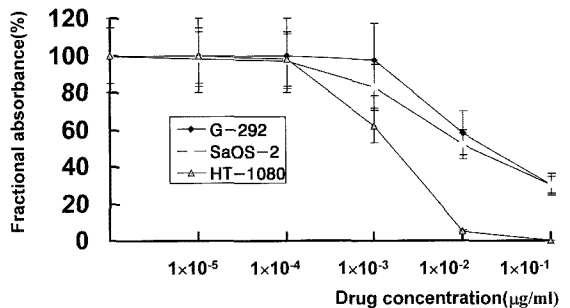


Fig. 2. Dose response curve of taxol. Taxol was potent to all the lines, especially to HT-1080

Table 4. The combination effect of adriamycin and taxol on G-292 cell line

Cone. of Taxol (IC ₅₀ unit)	Cone. of Adriamycin(IC ₅₀ unit)							Adriamycin (IC ₅₀ unit)
	0	0.006	0.02	0.06	0.2	0.6	2	
0	100	98	90	84	80	68	4	1.0
0.03	102	101	85	70	54	52	3	0.73
0.1	87	59	55	56	54	53	7	0.76
0.3	56	53	53	54	47	54	7	0.78
1	50	39	41	47	37	47	10	-
3	30	38	37	44	35	41	4	-
10	35	34	36	41	32	34	2	-
Taxol IC ₅₀ unit	1.0	0.4	0.41	0.6	0.19	0.6	-	-

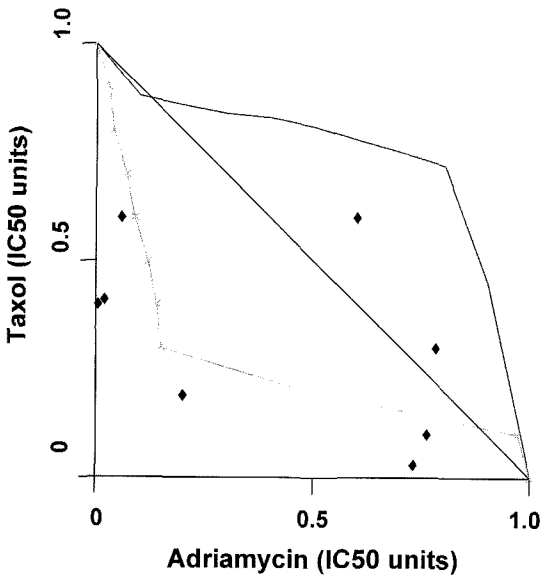


Fig. 3. Isobologram of taxol and adriamycin in IC₅₀ of G-292 cell line. Taxol and adriamycin had synergistic effects with 6 out of 8 isoboles in synergistic zone.

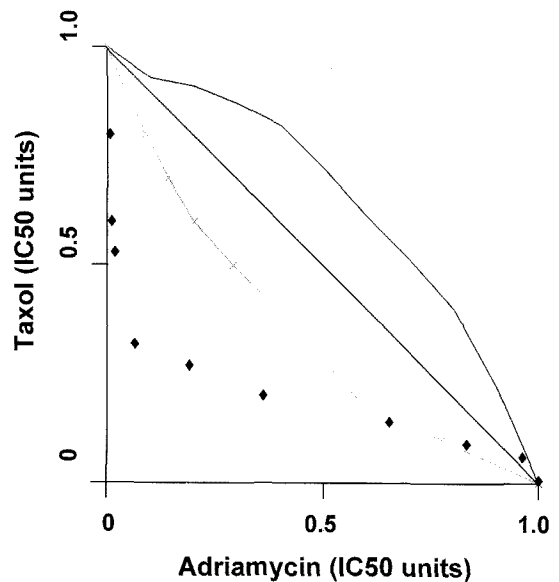


Fig. 4. Isobologram of taxol and adriamycin in IC₅₀ of SaOS-2 cell line. Taxol and adriamycin had synergistic effects with 7 out of 10 isoboles in synergistic zone.

생존시의 농도를 각각 구하여 IC₅₀ unit로 환산하여 taxol과 adriamycin의 농도가 적용된 8-10개의 isobole 값을 표에서 구하여 isobologram에 표시하였다. Table 4는 G-292 세포주에 대한 실험에서 isobologram을 얻기 위한 자료의 예이다. 표에서 taxol 농도 0.03 IC₅₀ unit column에서 50이 위치할 수 있는 곳은 52와 3사이이다. 52와 3에 해당하는 adriamycin의 농도는 0.6과 2 IC₅₀ unit이다. 농도 0.6과 2를 log scale로 하고 52와 3사이에서

50의 비율을 따져 구한 것이 adriamycin의 농도이다. 즉 taxol 0.03 IC₅₀ unit와 adriamycin 0.73 IC₅₀ unit가 IC₅₀의 isobole이며, 8개의 isobole을 구할 수 있었다. Taxol과 adriamycin을 병용 투여하여 IC₅₀의 isobole을 구하고 isobologram을 작성한 결과 G-292 세포주에서는 8개의 isobole 중 6개가 synergistic zone에 위치하여 taxol과 adriamycin의 상승작용이 인정되었으며(Fig. 3), SaOS-2 세포주에서는 10개의 isobole중 7개가 syn-

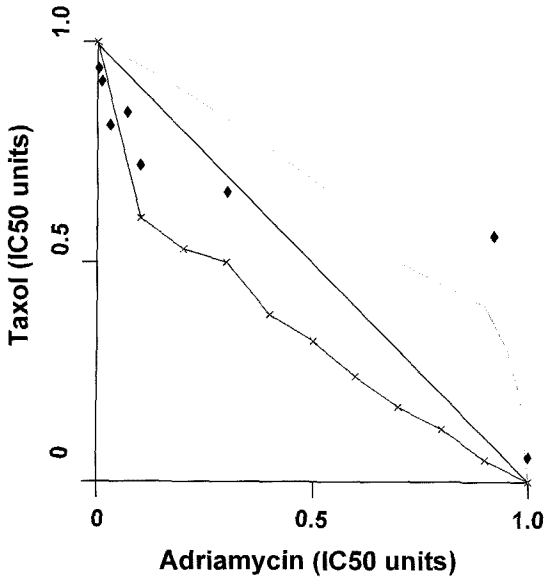


Fig. 5. Isobologram of taxol and adriamycin in IC_{50} of HT-1080 cell line. Taxol and adriamycin had synergistic effects with 3 out of 9 isoboles in synergistic zone.

ergistic zone에 위치하므로 상승작용이 인정되었다 (Fig. 4). 그러나 HT-1080은 9개의 isobole중 3개만이 synergistic zone에 위치하여 taxol과 adriamycin의 상승작용이 인정되지 않았다(Fig. 5).

고 찰

Taxol은 미국 국립 암연구소에서 35,000 여종의 식물을 대상으로 항암물질을 찾던 중 Wani 등²⁴⁾에 의해 발견되었다. Taxol의 화학적 구조는 taxane ring system으로 이루어져 있으며, C-13 ester side chain이 이 물질의 독특한 항미세소관 역할과 세포독성을 나타내는데 기여하고 있다. Taxol은 세포의 미세소관에 작용하여 항암 효과를 가지는데, 기존의 항미세소관 제제와는 달리 튜불린의 중합을 촉진하여 안정되고 비기능적인 미세소관을 형성함으로써 항암작용을 일으킬 수 있는 약제임이 알려졌다¹⁹⁾. 이 외에도 taxol에 민감한 세포는 taxol의 작용이 사라져도 계속하여 미세소관 다발을 형성하여, 세포 기관들의 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. Crossin과 Carney⁹⁾는 섬유모세포에서 성장인자에 의한 DNA합성이 촉진되는 과정에서 taxol이

세포주기의 G₀기에서 S기로의 전환을 억제한다고 하였고, Manfredi와 Horwitz¹³⁾는 taxol로 처리한 hela 세포들은 세포주기중 G₂기와 M기에 축적된다고 하였다. Bahalla 등²⁾은 taxol이 사람의 골수성 백혈병 세포들에서 nucleosome에 있는 DNA의 절편화를 초래하고, 자가계획 세포사(apoptosis)를 차단하는 것으로 알려진 bcl-2 종양 유전자의 표현을 감소시킨다고 하였다. 또한 taxol은 미세소관이 중합에 필요한 튜불린의 최소농도를 낮춤으로써 튜불린의 중합을 촉진하며^{10,21)}, 정상적인 기능을 수행할 수 없는 미세소관 다발들을 형성하여 세포들이 G₂기 혹은 M기에 머물도록 한다¹⁹⁾. 이러한 taxol은 백혈병에 상당한 세포독성을 나타내는 것으로 알려졌다고, 폐암, 악성 흑색종과 cisplatin 저항성 난소암에서 항암작용이 관찰되었다²⁾. 현재 임상에서는 난소암과 유방암 특히 유방암의 전이시에 사용 하여 좋은 결과를 발표하고 있다^{11,22)}. 그 외에도 전립선암^{12,16)}과 상피세포암 등에 치료 효과를 나타내고 있다. 부작용으로는 과민성이 가장 문제가 되고 그의 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 탈모증, 오심, 구토, 설사 등이 있다¹⁹⁾.

항암제의 효능을 검사하는 방법에는 시험관내 실험방법과 생체내 실험방법이 있는데, 이중 이식법과 subrenal capsular assay 등의 생체내 실험법과 시험관내 실험방법중 형태학적 변화 관찰법, 세포집락 분석법 등의 방법은 종양의 이식 성공률, 실험기간, 재현성 및 검사자의 주관 개입 등의 문제가 있어 정량적인 분석이 어렵다^{3,6,7,14)}. 시험관내 정량실험의 대표적인 방법인 MTT 분석법은 살아있는 세포가 mitochondria 의 탈수소 효소를 이용하여 MTT를 환원시켜 청색의 formazan 결정체를 만들므로써 이를 spectrophotometer를 이용하여 측정케 하는 시험 방법이다¹⁾. MTT분석법은 실험의 재현성이 뛰어나고, 실험에 걸리는 시간이 비교적 짧고, 분석 과정이 반자동화 되어 있으며, human tumor stem cell assay의 결과 사이에 비교적 양호한 상관관계를 보인다는 결과가 있어 항암제 선별 검사나 암 기초 연구에 널리 쓰이고 있다^{4,9)}.

저자들은 최근 새로운 항암물질로 각광 받고 있는 taxol이 악성 골종양 세포에는 어느 정도의 역가를 나타내는지 알아보기 위해 한국 세포주 은행에서 분양 받은 G-292, SaOS-2 및 HT-1080의 3가지 악

Table 5. The combination effect of adriamycin and taxol on SaOS-2 cell line

Cone. of Taxol (IC ₅₀ unit)	Cone. of Adriamycin(IC ₅₀ unit)							Adriamycin (IC ₅₀ unit)
	0	0.006	0.02	0.06	0.2	0.6	2	
0	100	100	98	97	87	62	7	1
0.006	96	95	94	91	86	63	5	1
0.06	91	91	90	89	81	62	4	0.96
0.09	86	85	82	80	73	57	5	0.83
0.2	73	70	65	61	56	45	3	0.36
0.6	56	53	48	35	33	30	3	0.011
6	31	30	29	6	7	10	3	-
Taxol IC ₅₀ unit	1	0.8	0.53	0.32	0.27	0.14	-	-

Table 6. The combination effect of adriamycin and taxol on HT-1080 cell line

Cone. of Taxol (IC ₅₀ unit)	Cone. of Adriamycin(IC ₅₀ unit)							Adriamycin (IC ₅₀ unit)	
	0	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	13		
0	100	98	98	96	93	91	50	15	1.0
0.056	100	99	99	99	96	92	50	15	1.0
0.56	90	86	85	84	80	77	48	16	0.92
0.84	64	63	58	55	48	45	31	10	0.07
1.87	42	38	41	37	34	31	23	2	-
2.8	24	23	19	17	18	18	13	5	-
5.6	10	2	2	1	4	3	10	7	-
Taxol IC ₅₀ unit	1.0	0.94	0.91	0.81	0.72	0.66	0.056	-	-

성 골종양 세포들을 대상으로 기존의 항암제인 methotrexate, adriamycin, ifosfamide, cisplatinum과 함께 taxol을 MTT분석법으로 정량하였다. 그 결과 Taxol의 IC₅₀이 G-292에서는 $2.7 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, SaOS-2에서는 $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, HT-1080에서는 $1.1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 이었다. 이러한 수치는 adriamycin, methotrexate, ifosfamide, cisplatinum의 결과치에 비하여 실험에 사용된 모든 세포주들에서 월등히 높은 역가를 보였다. 세가지 세포주에 대한 세포 독성의 강도는 taxol, adriamycin, methotrexate, cisplatinum, ifosfamide순이었다.

이러한 결과를 가지고, 저자들은 골종양 세포주들에 대해 기존의 항암제 보다 높은 세포독성을 나타내는 taxol 이 다른 항암제와 병용 투여 하였을 때는 어떠한 상호 작용을 나타내는지 알아보기 위하여, taxol 다음으로 높은 세포 독성을 나타내었던

adriamycin 과 병용 투여를 각 세포주들에 하였다. 일반적으로 상호작용을 평가할 때 두가지 약제를 각각 투여하여 생길 수 있는 효과를 합친 것으로 둘을 같이 투여하여 생기는 효과가 크면 상승작용(synergy), 같으면 부가작용(additivism), 작으면 길항작용(antagonism) 이라한다. 최근에 와서 두 항암제의 상호작용을 판정하는 좋은 방법으로서 isobologram을 이용한 정량적 분석법이 알려져 있다²³⁾. 종양세포에 대한 항암제 효과의 정량적인 분석은 clonogenic assay로는 불가능하였으나, Tsai등²³⁾이 반자동화되고 재현성이 뛰어난 MTT검사법을 이용하고 envelope of additivity개념이 포함된 isobologram 분석법으로 항암제의 상호작용에 대한 연구결과를 1989년에 처음으로 발표하였다. 두 약제를 같이 투여하여 어떤 특정한 효과를 나타낼 수 있는 농도조합을 그 효과의 "isobole"이라 한다. 가령 A, B 두 항암제의 농도를 각각 x, y축으로 하고 두

항암제를 투여하여 어떤 특정한 효과를 나타낼 수 있는 농도를 Ae, Be라 할 때, isobole이 Ae와 Be를 잇는 선에 위치하면 부가작용, 하부에 위치하면 상승작용을 쉽게 알아 볼 수 있다. 그러나 실제로 두 항암제를 같이 투여하였을 때 부가작용을 나타내는 것은 선이 아니고 면적이며 이를 “envelope of additivity”라 한다. 이 “envelope of additivity”는 두가지 mode로 구성된다. 즉 어떤 양의 A항암제가 y만큼 더 죽어야 한다고 할 때 필요한 B항암제의 양은 두가지 mode로 결정된다. Mode 1에서는 세포가 100% 생존해 있을 때 x만큼의 세포를 죽일 수 있는 양이 되며, 이때 필요한 B항암제의 양은 A항암제가 이미 죽인 세포 유무에 관계없이 일정하고 두 항암제는 완전히 독립적으로 작용한다. Mode 2에서는 두 약제가 완전히 의존적이며, A항암제가 작용하고 남아있는 세포중에 x만큼의 세포를 죽일 수 있는 양의 B항암제가 필요하다. 이 두 mode는 완전히 비슷한 극단을 나타내는 것이며, mode 1과 mode 2 사이 면적이 “envelope of additivity”이다.

이러한 isobologram 분석법으로 taxol 과 adriamycin의 병용 투여 결과, G-292 세포주와 SaOS-2 세포주에서 상당한 상승작용을 나타내었다

최근 Taxol을 다른 항암제로 치료하여 실패 하였던 환자나 전이가 있는 악성 골종양이나 연부조직 종양 환자에게 실험적 투여를 하였던 임상 보고가 있는데, 그 결과는 만족스럽지 않았다^{8,15)}. 그러나 Taxol은 다른 항암제가 가지고 있는 부작용도 있고, 가격이 아직은 상당히 고가 인점이 있지만, 저자들의 실험 결과처럼 악성 골종양 세포 주들에 대해 기존의 항암제들 보다 높은 세포독성을 보이고, 병용 투여시 상승작용을 가지는 것으로 보아, 새로운 항암제를 추구 하는 우리의 입장을 생각 할 때, 좀 더 많은 세포주들에 대한 실험을 다양한 항암제들과 실험해 보고, 일차약제로 투여 해 보거나, 이차 약제로 투여 하더라도 다양한 용량이나, 다른 약제와의 병용 투여 등의 다양한 임상적 연구가 뒤따른다면 좋은 결과가 있을 것으로 기대된다.

요 약

Taxol이 악성 골종양 세포에 어느 정도의 세포독성이 있는지를 평가하기 위해 한국세포주 은행에서

분양 받은 G-292, SaOS-2 및 HT-1080의 3가지 악성 골종양 세포들을 대상으로 기존의 항암제인 methotrexate, adriamycin, ifosfamide, cisplatinum과 함께 각각 투여하여 MTT분석법으로 정량 및 비교 분석하였으며, adriamycin과 taxol을 병용 투여하여 항암제의 상호작용을 isobologram 분석법으로 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Taxol의 악성 골종양 세포 주들에 대한 IC₅₀는 G-292에서는 $2.7 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, SaOS²에서는 $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, HT×1080에서는 $1.1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 이었다.
2. Taxol은 악성 골종양 세포주들에 대해 기존의 항암제들 보다 강한 세포독성을 보였으며, 기존 항암제의 세포 독성의 강도는 adriamycin이 제일 높은 역가를 보였으며 그 외 methotrexate, cisplatinum, ifosfamide순이었다.
3. Taxol과 adriamycin을 병용 투여하여 상호작용을 관찰한 결과 G-292와 SaOS-2 세포 주에서 상승효과가 관찰되었으며, HT-1080에서는 상승효과가 관찰되지 않았다.

REFERENCES

- 1) Alldy MC, Scudlero DA and Monks A : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro culture tetrazolium assay. *Cancer Res*, 48: 589-601, 1988.
- 2) Bahalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahoney ME and Huang Y : Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 7(4):563-568, 1993.
- 3) Bertelsen CA, Sondak VK and Mann BD : Chemosensitivity testing of human solid tumor, A review of 1582 assays with 258 clinical correlation. *Cancer*, 53:1240-1245, 1984.
- 4) Budach V, Bamberg M and Scheulen E : Preclinical chemosensitivity studies with human soft tissue sarcomas in nude mice. *Contr Oncol*, 26:168-175, 1987.
- 5) Crossin KL and Carney DH : Microtubule stabilization by taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and by epidermal growth factor. *Cell*, 27:314-350, 1981.

- 6) Durand RE and Goldie JH : Interaction of etoposide and cisplatin in an in vitro tumor model. *Cancer Treat Rep*, 72:673-679, 1987.
- 7) Finlay GJ, Wilson WR and Baguley BC : Comparison of in vitro activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukemia cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 22:655-662, 1986.
- 8) Glan VG, Johnson TJ, Marsh RW, Schuhmacher C and Lynch JW : A phase II trial of paclitaxel in the treatment of recurrent or metastatic soft tissue sarcomas or bone sarcomas. *J Exp Ther Oncol*, 1(3):186-190, 1996.
- 9) Hamburger AW and Salmon SE : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197:461-463, 1977.
- 10) Hamel E, Del CamPo AA and Lowe MC : Interactions of taxol, microtubule associated proteins and guanine nucleotides in tubulin polymerization. *J Biol Chem*, 256:1887-1897, 1981.
- 11) Holmes FA, Walters RS and Theriault RL: Phase II trial of taxol : An active drug in metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 83:1797-1805, 1991.
- 12) Jensen CG, Davison EA, Bowser SS and Rieder CL: Primary cilia cycle in PtK1 cells: Effects of colcemid and taxol on cilia formation and resorption. *Cell Motil Cytoskeleton*, 7(3):187-197, 1987.
- 13) Manfredi J and Horwitz SB : Taxol: An antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther*, 25:83-125, 1984.
- 14) Mann BD, Kern DH and Giuliano AE : Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. *Arch. Surg*, 117:33-36, 1982.
- 15) Patel SR, Papadopoulos NE, Plagel C, Linke KA, Moseley SH, Spirindinidis CH and Benjamin R : Phase II study of paclitaxel in patients with previously treated osteosarcoma and its variants. *Cancer*, 78(4):741-744, 1996.
- 16) Rainey WE, Kramer RE, Mason JI and Shay JW : The effects of taxol, a microtubule-stabilizing drug, steroidogenic cells. *J Cell Physiol*, 123:17-24, 1985.
- 17) Rosen G, Marcore RC and Caparros B: Primary osteogenic sarcoma. The rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer*, 43:2163-2177, 1987.
- 18) Rosenberg SA, Chabner BA and Young RC : Treatment of osteogenic sarcoma. Effect of adjuvant high-dose methotrexate after amputation. *Cancer Treat Rep*, 63:739-751, 1979.
- 19) Rowinsky EK, Cazannave LA and Donehower RC : Taxol: A novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst*, 82:1247-1259, 1990.
- 20) Rowinsky E, Donehower RC, Jones RJ and Tucker RW : Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. *Cancer Res*, 48:4093-4100, 1988.
- 21) Schiff PB and Horwitz SB : Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous GTP or microtubule-associated proteins. *Biochemistry*, 20:3247-3252, 1981.
- 22) Seidman A, Reichman B and Crown J : Activity of taxol with recombinant granulocyte colony-stimulating factor as first chemotherapy of patients with metastatic breast cancer(abstr). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 11:59, 1992.
- 23) Tsai CM, Gaxdar AF, Venzon DJ, Steinberg SM, Dedrick RL, Mulshine JL and Kramer BS : Lack of in Vitro Synergy between Etoposide and cis-Diammine-dichloroplatinum(II). *Cancer Res*, 49:2390-2397, 1989.
- 24) Wani MC, Taylor HL and Wall ME : The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*: Plant antitumor agents V. *J Am Chem Soc*, 893:2325-2327, 1971.