

## 신규항암제인 Heptaplatin의 인체 흑색종세포 (SK-MEL-28)에 대한 세포생존률 및 유세포 분석

최수라 · 명평근<sup>#</sup>

충남대학교 약학대학 임상생화학실

(Received October 6, 2003; Revised November 5, 2003)

### Cell Viability and Flow Cytometry Analysis of a Novel Antitumor Agent, Heptaplatin in Human Melanoma Cell Line, SK-MEL-28

Su-La Choi and Pyung-Keun Myung<sup>#</sup>

Lab. of Clinical Biochemistry, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Abstract** — Heptaplatin, cis-Malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum(II), is a novel platinum-based antitumor agent with clinical potential against human stomach cancer and the 3rd generation of the cisplatin. This study was performed to study how cisplatin, heptaplatin and sunpla which is a mixture of heptaplatin and mannitol (w : w=1 : 2) affect cell viability of SK-MEL-28 human melanoma cell line. Heptaplatin (IC<sub>50</sub>; 95.35 μM) and sunpla (IC<sub>50</sub>; 10.95 μM) were less effect than cisplatin (IC<sub>50</sub>; 10.92 μM) on the SK-MEL-28 cells. By cell cycle analysis using flow cytometry, it was identified that the cells were arrested at G2/M phase by cisplatin, heptaplatin and sunpla, and percentage of cell death group was increased according to increasing of time and concentration. These results suggest that cisplatin, heptaplatin and sunpla are a novel anticancer agent against human melanoma cell.

**Keywords** □ cisplatin, heptaplatin, sunpla, cell viability, flow cytometry

Cisplatin은 백금착제 항암제로써 DNA에 결합해서 그 기능을 파괴시킴으로 항암효과를 유도하는데,<sup>1-4)</sup> 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제 중 하나이며, 특히 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 위암, 자궁 경부암 그리고 방광암 등의 치료를 위해 사용되어지고 있다.<sup>5-7)</sup> 또 cisplatin은 위암, 폐암, 후두암 등을 치료하는 doxorubin, etoposide, bleomycin, 5-fluorouracil 등과 같은 다른 항암제와 혼합해서도 광범위하게 사용되어지고 있다.<sup>8-11)</sup> 그러나 cisplatin은 신장독성이나 위독성, 신경독성을 유발할 수 있으며, 매우 심한 오심과 구토증상을 나타내고,<sup>12-14)</sup> 유방암과 결장암 등의 치료에는 효과가 낮으며,<sup>15)</sup> cisplatin에 저항을 갖는 내성 세포를 만들어내어 항암 효과가 소실 될 수 있고,<sup>6,7,16-18)</sup> 물에 잘 녹지 않는 등의 문제점이 있어 사용이 빈번히 제한되어지고 있다. Cisplatin의 제 2세대 백금 착제 화합물로서 개발된 carboplatin은 cisplatin의 주된 독성인 오심, 구토, 신장 독성이나 신경계 독성이 크게 완화된 유도체이며, 혈중 단

백질과의 낮은 결합률로 생체내 이용률이 개선되었으며 수용성도 증가되었다. 그러나 골수독성은 cisplatin 보다 강하며 항암 효과도 상대적으로 낮고 항암 범위가 좁아 신장장애가 있는 난소암과 폐암환자에게 현재 제한적으로 사용되고 있다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위해 다시 개발된 약물로서 cisplatin의 제 3세대 백금 착제 화합물인 heptaplatin이 합성되었다(Fig. 1). Heptaplatin은 한국인에게 가장 많이 발생하는 위암을 치료하기 위한 목적으로 선경인더스트리에서 개발되었으며, 1999년 국내 신약 1호로 명명된 '선플라'의 원료이다. 이 heptaplatin은 수용액에서 안정하고 용해도가 좋으며, 물리화학적 안정성을 가지고 있고, 최적의 용량에서 신장독성이 없고, 쥐에 대한 실험에서 탁월한 항암 효과를 나타내었다.<sup>5,19-27)</sup> 또한 미국 National Cancer Institute(NCI)에서 수행되어진 여러 가지 암세포주에 대한 성장억제용량(GI<sub>50</sub>)과 치사용량(LC<sub>50</sub>)을 알아보는 실험에서도 비록 각 세포주 마다 최적용량은 달랐지만 암세포의 성장을 억제하거나 죽게하는 효과를 보였다.

본 연구에서는 오존층의 파괴에 따른 자외선과 여러 가지 화학오염 물질 등에 의해 현재 세계적으로 매년 약 5%의 비율로 성장하고 있는 피부암에 대한 항암제를 개발하기 위하여 피부암

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-821-5929 (팩스) 042-823-6566  
(E-mail) pyung@cnu.ac.kr

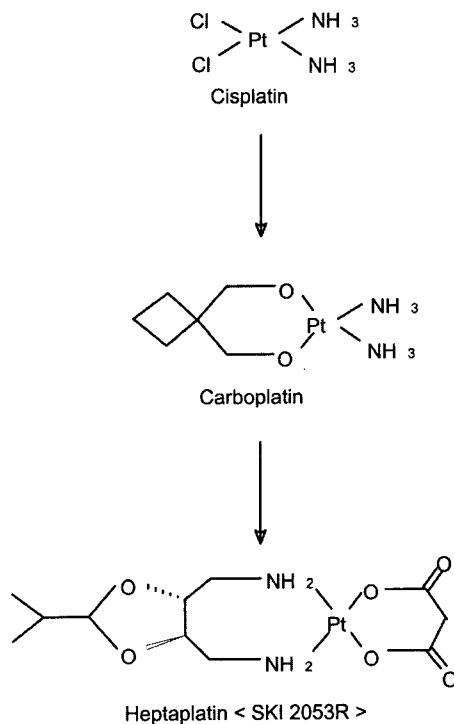


Fig. 1 - The structure of cisplatin (the 1st generation compound), carboplatin (the 2nd generation compound) and heptaplatin (the 3rd generation compound).

세포인 인체 흑색종 세포주(SK-MEL-28)에 대해 cisplatin, 그리고 heptaplatin에 mannitol을 첨가해서 제형으로 만든 sunpla에 의한 암세포성장억제를 비교 분석해 보았으며, 나아가 어떠한 세포주기를 억제함으로써 항암 효과를 나타내는지를 분석하였다.

## 실험방법

### 시약, 기구 및 기기

사용한 피부암 세포주인 SK-MEL-28 세포는 한국생명공학연구원에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양시 사용되는 RPMI-1640 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, phosphate buffer saline(PBS)는 Gibco에서, cisplatin, RNase 그리고 propidium iodide(PI)는 Sigma에서, heptaplatin과 sunpla는 신경인더스트리에서 공급받아 사용하였다. CO<sub>2</sub> 가스는 안전가스에서 구입하여 사용하였고, 그 외에 사용된 시약은 세포배양용 시약 또는 특급시약을 사용하였다. 세포수 계수는 hemacytometer를 이용하여 광학현미경(BHS, Olympus optical Co. Japan)으로 관찰하여 실시하였다. 5 ml flow cytometry용 tube는 Falcon #2052를 사용하였고, 세포주기특이성에 대한 DNA content의 분석은 충남대학교 약학대학의 FACSCalibur(Bectone&Dickinson, USA)을 이용하여 유세포 분석법으로 실시하였다.

### 세포배양

세포배양용 배지로서 56°C에서 미리 불활성화한 10% FBS와 penicillin-streptomycin 100 unit/ml이 포함된 RPMI-1640 배지가 사용되었으며, 세포는 모든 경우에 있어서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 CO<sub>2</sub> incubator(3546 S/N 26401-3156, Forma Scientific Inc., USA)를 사용하여 배양하였다. 세포의 회수방법으로는 세포를 배양하고 있던 배지를 조심스럽게 버리고 1×Trypsin-EDTA 용액(Gibco)으로 CO<sub>2</sub> incubator에서 2분간 반응시킨 후 세포를 떼어냈다. 그 후 원심분리하여 세포를 세척하고 회수하여 RPMI-1640 완전배지로 부유한 후 계대배양 하거나 실험에 사용하였다.

### 세포생존률 측정방법

24 well plate에 well당 5×10<sup>3</sup>개의 세포를 배양하고 24시간 후 cisplatin, heptaplatin, 선펠라를 최종농도가 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 그리고 100 μM이 되게 농도별로 처리하였다. 그리고 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 각 well을 시간별로 배양한 후 각각 꺼내 24 well 속의 배양액과 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 떼어낸 세포를 농도와 시간별로 구분한 FACS tube속에 완전히 옮겨 담았다. 이 FACS tube를 25°C, 1500 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 세포침전물에 PBS를 100 μl씩 넣었다. 세포를 부유한 후 10 μl씩 취해 미리 trypan blue용액을 10 μl씩 넣어 놓은 96 well에 각각 옮기고 잘 혼합한 후 hemacytometer와 coverglass 사이에 조심스럽게 주입하여 현미경상에 올려놓고 세포를 계수 하였다. Trypan blue용액을 흡수해서 파란색을 띄는 세포와 trypan blue용액을 흡수하지 않아 파란색을 띄지 않는 세포를 모두 센 후 % 값을 계산하였다. 위의 실험을 세 번 반복한 후 평균값과 표준오차를 계산하여 도식화하였다.

### DNA cell cycle 분석

T25 cm<sup>2</sup> flask에 5×10<sup>5</sup>개의 세포를 배양한 후 24시간이 지났을 때 cisplatin, heptaplatin 그리고 선펠라를 최종농도가 0, 1, 5, 10, 50 그리고 100 μM이 되게 농도별로 처리하였다. 24시간과 48시간 동안 각각 배양한 후에 T25 cm<sup>2</sup> flask속의 배양액을 농도와 시간별로 구분한 50 ml tube에 옮겨 담고 flask 바닥에 부착되어있는 세포를 전술한 세포회수 방법으로 모두 모아 각 tube에 합했다. 원심분리 후 상층액을 버리고 남아있는 세포 침전물을 PBS로 다시 세척하면서 FACS tube로 옮겼다. 다시 원심분리 후 상층액을 버리고 남아있는 세포 침전물을 75% EtOH 1 ml로 -20°C에서 24시간 동안 고정시켰다. 그리고 원심분리 후 EtOH를 버리고 고정된 세포 침전물을 PBS로 두 번 세척하고 20 μg/ml PI와 0.1 mg/ml RNase가 들어있는 PBS 1 ml을 세포 침전물에 넣고 어두운 실온에서 30분간 반응시켰다. 그런 후 flow cytometer로 세포를 분석하였다.

실험결과 및 고찰

Cisplatin, heptaplatin 그리고 선플라에 의한 세포생존율

Cisplatin, heptaplatin 그리고 선플라 각각의 최종농도를 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 그리고 100  $\mu\text{M}$ 이 되게 농도별로 처리하고 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 시간별로 배양한 후 SK-MEL-28 세포의 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 cisplatin을 투여하지 않은 세포에 비해 cisplatin을 투여한 세포들은 농도와 배양시간이 증가함에 따라 세포생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 0.001과 0.01  $\mu\text{M}$ 을 투여하였을 때에는 모든 배양시간에서 80% 이상의 세포생존율을 나타냈으며, 0.1  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서는 72시간 배양시, 50% 이하로 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히 100  $\mu\text{M}$ 을 투여하였을 때에는 시간이 증가함에 따라 세포의 생존율이 급격히 감소하는 것으로 나타났고, 48시간과 72시간 배양시에는 세포생존율이 각각  $17.5 \pm 4.33\%$ 와  $3.7 \pm 1.08\%$ 로 감소되어 이들 농도에서는 세포독성이 있는 것으로 평가되어졌다

(Fig. 2A).

Heptaplatin의 경우, 최종농도가 0.001, 0.01, 0.1 그리고 1  $\mu\text{M}$ 이 되게 처리하여 세포를 배양한 결과, 배양한 모든 시간에서 90% 이상의 세포생존율을 보였다(Fig. 2B). 10  $\mu\text{M}$ 을 투여한 경우에도 48시간 배양으로 91.5%의 높은 생존율을 보였지만 72시간 배양시에는 66.9%로 급격히 감소되는 것으로 나타났다. 그리고 72시간 배양시, 농도가 증가함에 따라 세포생존율은 감소하는 것으로 나타났지만 감소의 정도가 cisplatin의 경우보다는 완화되었으며, 특히 100  $\mu\text{M}$  투여시 세포생존율이 49.8%로 cisplatin의 3.7% 보다 매우 높은 생존율을 보였다.

선플라의 경우는 heptaplatin과 부형제로 사용된 mannitol이 1:2의 중량비로 혼합되어져 있기 때문에 선플라속에 함유되어져 있는 heptaplatin의 농도를 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 그리고 100  $\mu\text{M}$ 로 제조하여 실험하였다. 처리되어진 농도에서 6, 12 그리고 24시간 동안 배양한 결과, 80% 이상의 세포생존율을 나타내었다(Fig. 2C). 그러나 48시간과 72시간 동안 배양했을 때에는

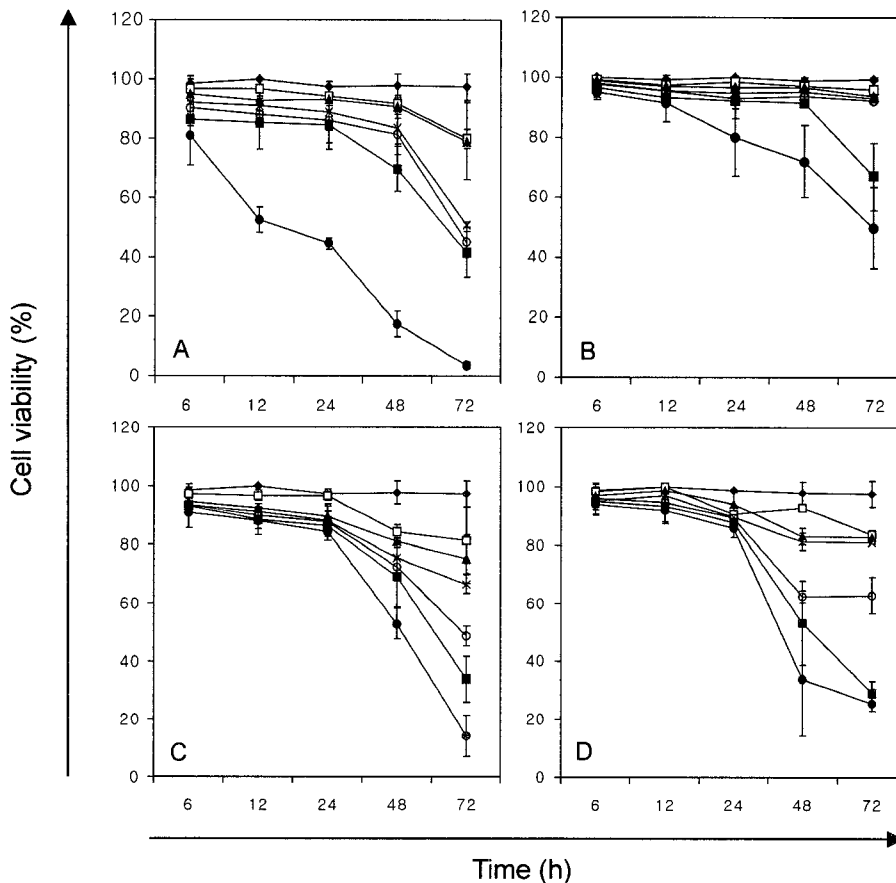


Fig. 2 - Time kinetics of viability of SK-MEL-28 cells treated with various concentrations of cisplatin, heptaplatin, sunpla and mannitol. SK-MEL-28 cells were treated with these compounds at concentrations of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{M}$  and incubated for 6, 12, 24, 48 and 72 h. The results represent cell viability and Bars indicate mean  $\pm$  SD from three independent experiments. It was represented A : cisplatin, B : heptaplatin, C : sunpla D : mannitol and ◆ : 0  $\mu\text{M}$ , □ : 0.001  $\mu\text{M}$ , ▲ : 0.01  $\mu\text{M}$ , × : 0.1  $\mu\text{M}$ , ○ : 1  $\mu\text{M}$ , ■ : 10  $\mu\text{M}$ , ● : 100  $\mu\text{M}$ .

농도가 증가함에 따라 세포생존률이 감소하는 경향을 나타내었다. 이 선플라의 IC<sub>50</sub>값은 72시간 배양시 10.95 μM로써, 순수한 원료인 heptaplatin(IC<sub>50</sub> : 95.35 μM)에 비해 더 낮은 농도에서 SK-MEL-28 세포를 죽일 수 있는 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. Heptaplatin과 선플라의 세포생존률 결과와 IC<sub>50</sub>값의 차이가 생기는 이유를 알아보기 위해 선플라에만 부형제로 포함되어져 있는 mannitol을 SK-MEL-28 세포에 처리하고 그 효과를 확인해 보았다(Fig. 2D).

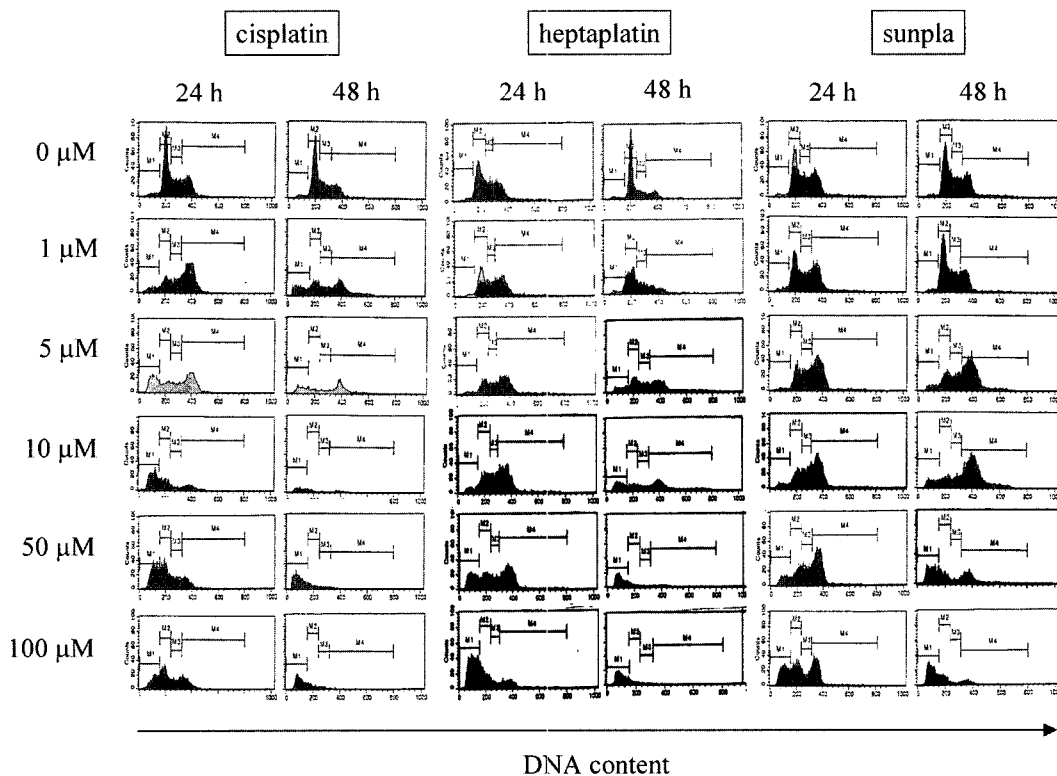
Mannitol에 의한 세포독성을 평가하기 위해 cisplatin, heptaplatin 그리고 선플라의 경우와 동일한 조건으로 실험한 결과, 0.001, 0.01 그리고 0.1 μM로 최종농도가 되게 처리한 후 배양한 모든 시간에서 80% 이상의 세포생존률을 보였다. 하지만 48시간과 72시간 배양시 1 μM 이상의 농도에서부터는 세포생존률 감소 폭이 증가했으며, 특히 72시간 배양시 100 μM에서는 25.3%로 감소된 세포생존률을 나타내었다. 선플라의 세포생존률 감소를 나타내는 Fig. 2C와 mannitol에 의한 세포생존률 감소를 나타내는 Fig. 2D의 결과를 비교했을 때, 그 감소의 유형이 유사한 것을 확인할 수 있었으며 선플라의 더 높은 세포생존률 감소는 부형제인 mannitol의 영향인 것으로 사료되어진다. 또한 부형제인 mannitol의 IC<sub>50</sub>값은 72시간 배양시 36.15 μM로써, heptaplatin에 비해 월등히 낮은 선플라의 IC<sub>50</sub>값을 설명해 주

는 것으로 볼 수 있었다.

**Flow cytometry에 의한 세포주기(cell cycle) 특이성 분석**

Cisplatin, heptaplatin 그리고 선플라의 각각의 최종농도가 0, 1, 5, 10, 50 그리고 100 μM이 되게 하여 1×10<sup>6</sup> 세포에 처리한 후 24시간과 48시간 동안 배양하여, 이 약물들이 SK-MEL-28 세포의 cell cycle에 어떠한 영향을 미치는지 flow cytometer로 분석하였다.

Cisplatin을 처리한 결과, 농도와 시간에 의존적으로 죽어가는 세포집단(cell death group)이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 그리고 이미 많은 연구들을 통해 보고되어진 바와 같이 cisplatin에 의해 cell cycle 중 G2/M기가 정체되는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3과 Table II, III에 나타난 값에서 알 수 있듯, 10 μM 처리 후 24시간과 48시간 동안 배양하였을 때, 각각 54.68±2.32%와 71.13±4.30%로 cell death group의 유동율이 가장 높은 것으로 나타났고, 50 μM과 100 μM에서 24시간 배양시 23.91±1.41%와 26.54±1.38%로 48시간 배양시 54.01±4.85와 74.08±7.58%로 오히려 cell death group의 유동율이 감소함을 볼 수 있었다. 또한 G2/M기의 분석결과, 24시간 배양시 1 μM에서 64.53±6.05%로 정체율이 가장 높았으며, 48시간 배양시에는 5 μM 처리시 42.08±1.79%로 정체율이 가장 컸다. 반면, G0/G1기와 S기는 24



**Fig. 3** – Cell cycle analysis of SK-MEL-28 cells by cisplatin, heptaplatin, and sunpla. Cells were treated with concentrations of 0, 1, 5, 10, 50 and 100 μM of these compounds for 24 h and 48 h. M1 to M4 represent cell death group, G0/G1, S and G2/M phase, respectively.

**Table I** – IC<sub>50</sub> value of compounds about SK-MEL-28 cells for 72 hrs

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)
Cisplatin	10.92
Heptaplatin	95.35
Sunpla <sup>a)</sup>	10.95
Mannitol	36.15

<sup>a)</sup>The mixture of heptaplatin and mannitol (w : w=1 : 2) to make a product.

시간과 48시간 배양시 cisplatin을 처리한 모든 농도에서의 유동율이 cisplatin을 처리하지 않은 세포의 유동율보다 낮은 유동율을 보였으므로 정체의 효과는 없는 것으로 확인되었다.

Heptaplatin에 의한 cell cycle 분석 결과, cisplatin의 결과와 유사함을 보였다. G2/M기를 정체하는 효과를 보였으며, 농도와 시간에 의존적으로 cell death group이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). Heptaplatin을 처리하여 24시간과 48시간 동안 배양한 세포 모두 처리한 가장 높은 농도인 100 μM에서 각각 44.79 ± 9.78%와 82.75 ± 2.49%로 가장 높은 cell death group 유동율이 나타났으며, cisplatin보다는 더 높은 농도에서 cisplatin과 유사한 cell death group 유동율을 얻을 수 있었다. 그리고 G2/M기는 24시간 배양시 10 μM에서 47.47 ± 10.42%로, 48시간 배양시 5 μM에서 39.01 ± 0.56%로 정체률이 가장 높았다. 또한 G0/G1기와 S기를 분석한 결과, 이 두 기간에서는 정체되는 부분이 없었으며, heptaplatin을 처리하지 않은 세포보다 처리하여 배양한 세포의 G0/G1기 유동율이 heptaplatin의 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. S기는 24시간 배양시 10 μM 농도까지는 heptaplatin을 처리하지 않은 세포와 비슷한 유동율을 보이다가 그 이상의 농도에서는 감소하였으며, 48시간 배양시에는 5 μM

이상의 농도에서부터 유동율이 감소하였다(Tables II, III).

선플라에 의한 cell cycle을 분석한 결과, 이 경우도 역시 SK-MEL-28 세포에 G2/M기의 정체를 일으켰으며, 농도와 시간에 의존적으로 cell death group을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). Heptaplatin과 선플라의 결과를 비교해 볼 때, 50 μM과 100 μM을 처리한 후 24시간 배양시 heptaplatin의 경우 각각 16.36 ± 6.92%와 44.79 ± 9.78%의 cell death group 유동율을 보인 반면, 선플라에서는 11.39 ± 3.39%와 32.14 ± 6.09%로 약간 낮게 나타났다. 48시간 배양시에는 heptaplatin의 경우, 50과 100 μM에서 각각 77.9 ± 6.43%와 82.75 ± 2.49%로 높게 나타난 반면, 선플라는 37.5 ± 8.69%와 58.47 ± 8.90%로 비교적 낮은 cell death group 유동율을 나타내었다. G2/M기는 24시간과 48시간 배양시 모두 10 μM을 처리하였을 때, 49.7 ± 2.43%와 62.53 ± 1.70%로 가장 정체가 심했다(Tables II, III). 이는 세포생존율 결과로부터 얻은 IC<sub>50</sub>값과는 상반된 결과로, 선플라는 혼합되어진 mannitol에 의한 효과로 인해 heptaplatin만을 처리한 세포에서 보다 더 높은 세포독성을 유발시키는 것으로 생각되어지며, heptaplatin은 cisplatin과 같이 DNA에 선택성을 나타내며, 부형제인 mannitol은 heptaplatin이 세포내의 DNA를 공격하는 것을 방해하는 것으로 사료되어진다. Cisplatin과 heptaplatin의 경우에서와 같이 선플라에 의해서도 세포의 G0/G1기와 S기가 정체되지 않았다. 24시간과 48시간 배양시 모두, 선플라의 농도가 증가할수록 G0/G1기의 유동율은 감소하였지만, 50 μM과 100 μM을 처리하였을 때에는 24시간 배양시 24.36 ± 3.84%에서 30.57 ± 2.25%로, 48시간 배양시 24.57 ± 7.54에서 30.26 ± 5.83%로 증가함을 나타냈다. 그리고 S기를 분석한 결과, 24시간 배양시에는 50 μM까지 거의 일정한 유동율을 보였으며, 48시간 배양시에는 농도

**Table II** – Cell cycle analysis<sup>a</sup> of SK-MEL-28 cell cultured for 24 h after treatment of cisplatin, heptaplatin and sunpla

p <sup>b</sup>	Cisplatin				Heptaplatin				Sunpla			
	Cell death	G0/G1	S	G2/M	Cell death	G0/G1	S	G2/M	Cell death	G0/G1	S	G2/M
0	1.590 ±0.38	48.42 ±1.72	18.62 ±3.63	31.24 ±4.49	2.64 ±0.43	51.76 ±3.14	24.71 ±1.80	21.11 ±4.93	2.28 ±1.22	49.66 ±4.90	21.56 ±6.16	26.5 ±3.31
1	3.95 ±1.59	14.33 ±3.11	18.83 ±0.61	64.53 ±6.05	2.5 ±0.25	40.34 ±1.34	25.83 ±2.79	31.08 ±2.21	2.14 ±0.67	42.84 ±4.29	22.04 ±1.99	32.29 ±2.60
5	22.04 ±4.69	20.57 ±5.32	14.47 ±1.45	42.18 ±3.69	2.94 ±1.08	24.26 ±1.97	24.97 ±1.91	47.31 ±3.98	2.56 ±0.55	29.17 ±5.69	23.84 ±5.94	45.15 ±5.46
10	54.68 ±2.32	24.25 ±2.05	8.31 ±0.79	13.98 ±1.57	4.12 ±1.84	22.52 ±6.25	25.5 ±4.09	47.47 ±10.42	4.58 ±1.43	21.24 ±1.77	24.75 ±2.37	49.7 ±2.43
50	23.91 ±1.41	44.43 ±8.55	15.02 ±1.55	15.99 ±3.11	16.36 ±6.92	21.76 ±1.96	18.67 ±1.46	43.5 ±7.33	11.39 ±3.39	24.36 ±3.84	22.45 ±6.97	42.9 ±2.94
100	26.54 ±1.38	36.1 ±0.90	19.18 ±1.19	20.18 ±2.02	44.79 ±9.78	35.31 ±6.18	7.05 ±0.98	13.38 ±7.06	32.14 ±6.09	30.57 ±2.25	13.46 ±2.76	25.03 ±3.83

SK-MEL-28 cells were treated with various concentrations of cisplatin, heptaplatin and sunpla for 24 h. And cell cycle analysis was performed by flow cytometer. Data represent percentage of mean ± S.D from three independent experiments.

<sup>a</sup>Cell cycle analysis was performed by flow cytometer.

<sup>b</sup>SK-MEL-28 cells were incubated for 24 h after treatment of compounds.

<sup>c</sup>SK-MEL-28 cells were treated with cisplatin, heptaplatin and sunpla at concentration of 0, 1, 5, 10, 50 and 100 μM.

**Table III** – Cell cycle analysis<sup>a</sup> of SK-MEL-28 cell cultured for 48 h after treatment of cisplatin, heptaplatin and sunpla

C. <sup>c</sup>	p <sup>b</sup>	Cisplatin				Heptaplatin				Sunpla			
		Cell death	G0/G1	S	G2/M	Cell death	G0/G1	S	G2/M	Cell death	G0/G1	S	G2/M
0		2.07	61.23	19.36	17.65	2.14	63.96	16.6	13.4	3.18	51.11	22.4	22.73
		±0.47	±0.96	±0.44	±0.30	±0.63	±7.70	±4.04	±4.32	±1.20	±2.13	±4.42	±2.85
1		17.82	29.46	15	37.81	4.65	55.19	20.64	17.45	3.3	49.58	19.05	28.52
		±1.49	±1.79	±0.77	±2.21	±1.45	±1.67	±2.13	±1.69	±2.40	±3.16	±3.79	±4.21
5		35.95	15.35	7.59	42.08	10.97	32.57	16.82	39.01	3.58	21.99	17.81	56
		±3.48	±1.80	±0.83	±1.79	±0.67	±0.63	±0.44	±0.56	±1.02	±5.77	±4.49	±5.60
10		71.13	19.53	2.23	9.71	29.83	19.21	11.5	37.8	9.37	15.13	12.27	62.53
		±4.30	±2.21	±0.62	±1.90	±2.62	±0.68	±0.78	±1.57	±3.24	±1.14	±2.29	±1.70
50		54.01	36.97	3.52	0.09	77.9	13.42	2.21	6.26	37.5	24.57	5.63	29.24
		±4.85	±3.14	±1.72	±0.09	±6.43	±1.52	±1.05	±4.67	±8.69	±7.54	±0.10	±3.27
100		74.08	18.28	4.31	1.21	82.75	15.66	1	0.52	58.47	30.26	3.06	7.11
		±7.58	±4.84	±1.74	±1.14	±2.49	±2.27	±0.08	±0.36	±8.90	±5.83	±1.08	±0.79

SK-MEL-28 cells were treated with various concentrations of cisplatin, heptaplatin and sunpla for 24h. And cell cycle analysis was performed by flow cytometer. Data represent percentage of mean ± S.D. from three independent experiments.

<sup>a</sup>Cell cycle analysis was performed by flow cytometer.

<sup>b</sup>SK-MEL-28 cells were incubated for 24 h after treatment of compounds.

<sup>c</sup>SK-MEL-28 cells were treated with cisplatin, heptaplatin and sunpla at concentration of 0, 1, 5, 10, 50 and 100  $\mu$ M.

가 증가할수록 유동율이 감소하는 경향을 보였다(Tables II, III).

그러므로 Cell cycle이 G2/M기에서 정체된다 함은 Cdc2와 cyclin A 또는 cyclin B의 결합에 문제가 생겼다 함을 의미하며, 특히 M기의 특이적인 유비키티화 효소인 APC가 cyclin B를 유비키티화 하는데, 이 cyclin B가 유비키티화 되지 않거나, 이 유비키티화된 cyclin B가 프로테아좀에 의해 분해되지 않으면 cell cycle은 정체되게 된다.<sup>20)</sup> 이들의 과정은 apoptosis를 일으켜 암 세포를 죽일 수 있는 하나의 방법이며, 특히 현재 항암제로 사용되는 cisplatin처럼 그 제 3세대 화합물인 heptaplatin과 그 제형인 선플라가 유사한 결과를 나타냄을 보인 바, 현재 이들이 SK-MEL-28 세포에 대하여 세포사멸과 어떠한 기전으로 apoptosis가 일어나는지의 연구가 진행되고 있는 중이다.

## 결 론

현재 세계적으로 매년 약 5%의 비율로 성장하고 있는 피부암에 대한 항암제를 개발하기 위하여 피부암 세포인 인체 흑색종 세포주(SK-MEL-28)에 대해 한국 신약 1호인 sunpla의 주성분인 heptaplatin과 cisplatin, 그리고 heptaplatin에 mannitol을 첨가해서 제형으로 만든 sunpla들에 의한 피부암 세포성장억제에 대한 비교 분석과 이들이 어떠한 세포주기를 억제함으로써 항암 효과를 나타내는지를 분석한 결과는 다음과 같다.

1. Cisplatin, heptaplatin 그리고 선플라 각각의 최종농도를 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 그리고 100  $\mu$ M이 되게 농도별로 처리하고 72시간 배양한 후 SK-MEL-28 세포의 세포생존율을 측정된 결과 cisplatin의 IC<sub>50</sub>값은 10.92  $\mu$ M로써, 선플라(IC<sub>50</sub>=10.95  $\mu$ M)와 비슷하며 선플라는 순수한 원료인 heptaplatin(IC<sub>50</sub> :

95.35  $\mu$ M)에 비해 더 낮은 농도에서 SK-MEL-28 세포를 죽일 수 있는 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 한편 부형제인 mannitol의 IC<sub>50</sub>값은 36.15  $\mu$ M로써, heptaplatin에 비해 월등히 낮아진 선플라의 IC<sub>50</sub>값에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있었다.

2. Cisplatin, heptaplatin 그리고 선플라의 각각의 최종농도가 0, 1, 5, 10, 50 그리고 100  $\mu$ M이 되게 하여 SK-MEL-28 세포(1×10<sup>6</sup> 세포)에 처리한 후 24시간과 48시간 동안 배양하여, 이 약물들이 SK-MEL-28 세포의 cell cycle에 어떠한 영향을 미치는지 flow cytometer로 분석한 결과 cisplatin과 heptaplatin 그리고 선플라에 의해 cell cycle 중 G2/M기가 정체되는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 cisplatin과 heptaplatin 그리고 선플라가 피부암세포에 유사한 항암성 효과를 나타낸다고 사료되어진다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-03003-0) 지원과 충남대학교 암연구소의 일부지원을 받아 수행되었기에 이에 감사드립니다. 또한 heptaplatin과 sunpla를 제공해주신 이화여자대학교 약학대학 김대기 박사께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Kaufmann, S. H. : Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptoyecin, and other cytotoxic anticancer drugs : a cautionary note. *Cancer Res.* **49**, 5870 (1989).
- 2) Barry, M. A., Behnke, C. A. and Eastman, A. : Activation of

- programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anti-cancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2353 (1990)
- 3) O'Connor, P. M., Wastermann, K., Sarang, M., Magrath, I., Bohr, V. A. and Kohn, K. W. : Relationship between DNA cross-links, cell cycle, and apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines differing in sensitivity to nitrogen mustard. *Cancer Res.* **51**, 6550 (1991).
  - 4) Miyashita, T. and Reed, J. C. : *Blood* **81**, 151 (1993).
  - 5) Kim, D.-K., Kim, C., Gam, J., Cho, Y.-B., Hong, W.-S. and Park, J.-G. : *J. Medicinal Chemistry* **37**, 1471 (1994).
  - 6) Loehrer, P. J. and Einhorn, L. H. : Drugs five years later. cisplatin. *Ann. Inter. Med.* **100**, 704 (1984).
  - 7) Ozols, R. F. and Young, R. C. : Chemotherapy of ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **11**, 251 (1984).
  - 8) Fiorentino, M. V. and Ghiotto, C. : Platinum, the synergistic drug, from clinical evidence to laboratory suggestions. in platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy; Nicolini, M., Ed., *Martinus Nijhoff Publishing. Boston* 415 (1988).
  - 9) Choksi, A. and Hong, W. K. : Chemotherapy of head and neck cancer. *Boston* 375 (1988).
  - 10) Paccagnella, A., Favaretto, G. and Fiorentino, M. V. : Chemotherapy of lung cancer. *Boston* 394 (1988)
  - 11) Wagener, D. J., Yap, S. H., Wobbes, T., Burghouts, J. T., van Dam, F. E., Hillem, H. F., Hoogendoorn, G. J., Scheerder, H. and van der Vert, S. G. : Phase II trial of 5-fluorouracil, adriamycin and cisplatin (FAP) in advanced gastric cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **15**, 86 (1985).
  - 12) Prestayko, A. W., Crooke, S. T. and Carter, S. K., Eds. : *Academic Press. Ins. New York*, 317 (1980).
  - 13) Von Hoff, D. D., Schilsky, R., Reichert, C. M., Reddick, R. L., Rozencweig, M., Young, R. C. and Muggia, F. M. : Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II) in man. *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1527 (1979).
  - 14) Krakoff, I. H. : Nephrotoxicity of cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1523 (1979).
  - 15) Iahibiki, K., Kumai, K., Kodaira, S., Abe, O., Yamamoto, K., Oodchi, T., Fukaya, Y., Kimura, K., Takamatsu, K., Ootsuka, E., Sakabe, T., Nishiyama, K., Sekizawa, Y., Ooide, N., Tsuchiya, S., Togo, S., Ishida, T., Mishima, Y., Ogoshi, K. and Mitomi, T. : Phase II study with cisplatin in advanced stomach and colon carcinoma. *Jpn. J. Cancer Chemother.* **16**, 3185 (1989).
  - 16) Hong, W. S., Saijo, N., Sasaki, Y., Minato, K., Nakano, H., Nakagawa, K., Fujiwara, Y., Nomura, K. and Twentymann, P. R. : Establishment and characterization of cisplatin-resistant sub-lines of human lung cancer lines. *Int. J. Cancer* **41**, 462 (1988).
  - 17) Inoue, K., Mukaiyama, T., Mitsui, I. and Ogawa, M. : *In vitro* evaluation of anticancer drugs in relation to development of drug resistance in the human tumor clonogenic assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **15**, 208 (1985).
  - 18) Ozols, R. F. : Pharmacologic reversal of drug resistance in ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **12**, 7 (1985).
  - 19) Kim, D. K., Kim, H. T., Cho, Y. B., Tai, T. H., Ahn, J. S., Kim, T. S., Kim, K. H. and Hong, W. S. : Antitumor activity of cis-malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum (II), a new platinum analogue, as an anticancer agent. *Cancer Chemother Pharmacol.* **35**, 441 (1995).
  - 20) Glotzer, M. : Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132 (1991).