

인체 대장암세포 다층배양계에서 파크리탁셀의 투과

최미선 · 박종국 · 알-압드 아메드 · 구효정[†]

가톨릭대학교 의과대학 생명과학과
(2006년 11월 2일 접수 · 2006년 12월 8일 승인)

Penetration of Paclitaxel in Multicellular Layers of Human Colorectal Cancer Cells

Mi-Sun Choi, Jong-Kook Park, Ahmed M. AL-Abd, and Hyo-jeong Kuh[†]

Department of Biomedical Sciences, College of Medicine, The Catholic Univ. of Korea, Seoul

(Received November 2, 2006 · Accepted December 8, 2006)

ABSTRACT – Paclitaxel is an important chemotherapeutic agent for the treatment of human solid tumors. Multicellular resistance (MCR) is considered to be a major mechanism of resistance of human solid tumors to chemotherapeutic agent such as paclitaxel, which includes barriers to drug penetration through tumor tissues. Multicellular layers (MCL) cultures resemble *in vivo* tumor condition in terms of MCR and has been used successfully to produce clinically relevant data. In the present study, we evaluated the penetration characteristics and post-penetration anti-proliferative activity of paclitaxel using MCL of human colorectal cancer cells (DLD-1 and HT-29) grown in Transwell inserts. The penetration of [¹⁴C]-paclitaxel was slower than that of mannitol which penetrates via paracellular pathway in DLD-1 MCL. The penetration of [¹⁴C]-paclitaxel was faster in HT-29 MCL compared to DLD-1 MCL, i.e., at 10 μM 100% and 40% penetration were observed after 48 hr incubation for HT-29 and DLD-1 cells, respectively. When calculated using anti-proliferative activity in the conditioned media of bottom chamber, the penetration after 24 hr was very limited (less than 50%) and concentration-dependent at the concentrations tested in both MCL's. These results suggest that limited and differential penetration of paclitaxel in tumor tissues may contribute to lower and differential efficacy against human solid tumors.

Key words – Paclitaxel, Multicellular layers, Tissue penetration

파크리탁셀은 20여 년 전 개발된 중요한 항암제중의 하나로 특히 유방암과 난소암에 그 효과를 인정받고 있는 약물이다. 세포 증식 과정에 중요한 영향을 미치는 튜블린(tubulin)의 중합(polymerization)에 주로 작용한다. 즉, 세포의 증식분열 시 미세소관(microtubule)을 과다 안정화시켜 정상적인 세포 분열이 일어날 수 없게 하고 결과적으로 세포 증식을 억제한다.^{1,2)}

인체고형암은 파크리탁셀을 포함한 다수의 항암제들에 대해 내성을 보이기 때문에 항암 화학요법으로 충분한 치료 효과를 얻지 못하는 문제점이 있다.³⁾ 이러한 고형암의 항암제 내성기전의 연구에는 주로 단층세포배양 실험계가 이용되었으며 여러 분자유전학적 기전들이 알려져 있는데 주로 세포 사멸 유도 억제, 위상이성질화효소(topoisomerase) 발현과 DNA 수복 효소(repair enzyme)의 변화 등이다.⁴⁾ 그러나 이러한 기전보다 임상적으로 관련성이 있다고 보고되고 있는 내성기전은 고형암 조직의 미세환경(microenvironment)에 의

한 내성과 삼차원적 다세포 구조 내 세포 접촉으로 유도되는 다세포 내성(multicellular resistance, MCR)이다. 한편 이러한 약력학적(pharmacodynamic) 요인 이외에 보다 근본적인 원인으로 약동학적(pharmacokinetic) 요인, 즉 약물전달 장애(조직 내 유효한 약물농도가 도달 될 수 있는가)에 대한 의견이 최근 대두되고 있다.

고형암에서는 모세혈관 시스템이 불규칙적으로 형성 분포되어 있기 때문에 고형암 조직 내의 세포들은 정상적으로 기능 할 수 있는 혈관으로부터 멀어지게 되고 따라서 약물의 투과 및 전달에 크게 제한을 받게 된다.^{5,6)} 또한 고형암 조직에서는 용적류 수송(convection)에 의한 약물 전달을 방해하는 주요 인자인 간질압력(interstitial fluid pressure, IFP)이 높아서 혈관 밖으로 빠져나온 약물이 조직을 투과해 혈관에서 먼 거리까지 이동하고 분포되기가 어렵다.⁷⁾ 이러한 요인들에 의해 독소루비신의 조직투과 및 분포 장애가 보고된 바 있고 조직 투과를 증진시키기 위해 hyaluronidase를 이용한 간질압력의 감소가 시도되었다.^{8,9)}

파크리탁셀의 경우에도 조직 내 투과 장애가 계속 보고되

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)592-2422, E-mail : hkuh@catholic.ac.kr

어 왔다. *In vitro* 조직배양계(histoculture)에서도 파크리탁셀이 조직 편의 가장자리(periphery)에 과다 축적되며 내부로의 투과가 매우 제한적이라는 보고가 있었다.¹⁰⁾ 이 투과 장애는 세포 밀도에 기인하는 것으로 생각되었으며 약물 투여 후 일정 시간 경과 후 유도되는 세포사멸을 통해 세포 밀도가 감소하면 가장자리에 축적되었던 파크리탁셀이 조직 전체에 걸쳐 분포하게 된다고 보고되었다.¹¹⁾

삼차원적인 고형암 조직에서의 약물 투과를 연구하기 위해서 Hicks와 Cowan(1996)에 의해 개발된 다층암세포 배양계(multicellular layers, MCL)는 인체고형암의 *in vivo* 특성을 가장 유사하게 재현할 수 있는 *in vitro* 삼차원 실험계의 하나이다.^{5,12,13)} 이러한 다층암세포 배양계를 이용하여 항암제의 약물 투과장애를 평가하고 투과를 증진시키려는 연구들이 현재까지도 꾸준히 진행되고 있다.¹⁴⁾ 한편, 최근에는 고형암에서 항암화학요법에 대한 내성연구 중 약물투과 장애가 간과되어 왔음이 주장된 바 있다.¹⁵⁾

본 연구에서는 대장암세포주인 DLD-1과 HT-29의 삼차원 다층암세포 배양계를 이용하여 파크리탁셀의 투과 특성을 비교하였다. 이 두 세포주간에 약물감수성 차이와 약물투과 차이를 비교하여 약물의 투과 차이가 파크리탁셀의 전체 항암 효과 차이에 기여하는지를 평가하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 재료

파크리탁셀(paclitaxel, PTX)은 한미약품(서울, 한국)에서 제공받았다. [¹⁴C]-Mannitol(specific activity: 53 mCi/mmol)

및 [¹⁴C]-PTX(specific activity: 73 mCi/mmol)은 Moravek (Brea, CA, 미국)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Welgene Inc.(Sugar Land, TX, 미국)에서 구입하였고 Sulfordamine B(SRB)와 Trichloroacetic acid(TAC), Glacial acetic acid등 기타 시약들은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다.

세포배양조건

DLD-1과 HT-29는 인체 대장암 세포주로서 한국세포주은행(서울, 한국)에서 분양받았다. 세포는 10% FBS, 페니실린(72 unit/mL), 스트렙토마이신(100 µg/mL)이 함유된 RPMI-1640(Gibco BRL, Grand Island, 미국)으로 배양하였다. 배양기에는 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였고, 온도 37°C, 습도 95%가 유지되도록 하였다. 세포의 성장이 합류상태(confluence)에 이르면 trypsin-EDTA(0.05%, w/v)를 처리한 후 계대배양하였다.

다층암세포의 형성(multicellular layers, MCL)

자체 제작한 배양용기(82×57×48 mm(W×L×H); V=150 mL, Figure 1A)에 트랜스웰 인서트(Transwell insert, Corning Costar, Acton, 미국)를 장착시켜 배양하였다. 트랜스웰 인서트 막의 상위 챔버(top chamber, TC)에 3×10⁵개/200 µL의 세포를 접종하고 4~5시간 정도 방치하여 세포가 세공막(Transwell polycarbonate membrane)에 부착하도록 방치하였다. 배양용기에는 100 mL의 배지를 채워 인서트의 세공막이 배양기의 배지에 잠기도록 하였고, 다시 4~5시간이 경과된 후 50 mL의 배지를 배양용기에 더 가하여 배지의 총 양을

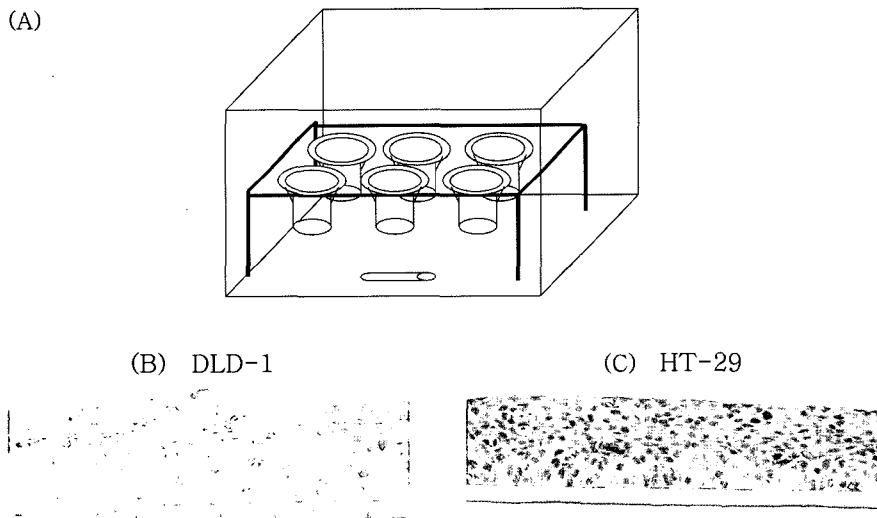


Figure 1—Culture system used to grow cancer cells in the form of MCLs (A) and representative H&E histological crosssection of MCLs of DLD-1 (B) and HT-29 cells (C) after growing for 5 days.

150 mL로 맞추고 세포 배양기 내에서 교반기(40회/1분)를 이용하여 배양하였다. 5일간 배양하여 형성된 다중암세포의 포매 절편을 얻기 위해 4% formaldehyde로 고정한 후 다중세포가 배양된 트랜스웰 인서트 막을 수직방향으로 도려내었다. 트랜스웰 인서트와 분리되어진 다중암세포는 형태 변형을 방지하기 위해 카세트(embedding cassette)에 넣고 탈수과정을 거쳤다. 파라핀에 포매하여 5 µm의 두께로 자르고 그 절편을 H&E 염색하여 형성상태를 관찰하였다. 다중암세포의 두께측정은 전체 절편 중 대표적인 부분을 세군데 선택하여 접안렌즈의 격자를 마이크로미터(micrometer)로 보정한 후 각 시료의 두께를 측정하였다.

[¹⁴C]-만니톨 및 [¹⁴C]-파크리타셀의 투과도 측정

5일 배양한 DLD-1과 HT-29의 다중암세포에서 [¹⁴C]-만니톨과 [¹⁴C]-파크리타셀의 투과도를 비교하였다. 트랜스웰 인서트를 6 웰 플레이트(Nunc, Denmark, MA)에 장착하되 하위 챔버의 바닥에 닿지 않고 일정한 거리를 유지할 수 있도록 지지대 역할의 어댑터를 이용하였다. 각 웰당 하위 챔버(bottom chamber, BC) 배지는 7 mL씩 넣었으며 상위 챔버에 8 µM의 [¹⁴C]-만니톨 또는 10 µM의 [¹⁴C]-파크리타셀을 각각 100 µL 주입하였다. 5% CO₂와 95% 공기가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였으며 일정 시간마다 하위의 배지 분획 100 µL를 채취하고 동량의 새 배지 100 µL를 하위 챔버에 넣어 분획 채취에 의한 배지 손실을 보완해 주었다. 취한 샘플은 liquid scintillation cocktail(Perkin Elmer, Boston, MA, 미국) 2 mL과 섞어 liquid scintillation counter(Packard Tri-Carb 2300 TR, Downers Grove, IL, 미국)로 배지샘플 내 [¹⁴C]의 양을 측정하였다.

단층배양세포에서 파크리타셀 항증식 효과 측정

DLD-1과 HT-29 세포를 96 웰 플레이트에 1,000개씩 100 µL/웰 단위로 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에는 다양한 농도의 파크리타셀을 처리하여 72시간 노출시킨 후 sulforhodamine B(SRB) assay로 약물의 세포 생존율을 측정하였다. 이것은 살아있는 세포의 단백질이 염색되는 원리로 10% trichloroacetic acid(St. Louis, MO, 미국) 150 µL를 이용하여 4°C에서 1시간 동안 고정하고 0.4% SRB(St. Louis, MO, 미국) 용액으로 10분간 염색하였다. 과량의 SRB 용액은 1% glacial acetic acid(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, 미국)로 3회 세척하였다. 96 웰 플레이트를 상온에서 건조시킨 후 10 mM Tris-HCl(Amresco, Solon, OH, 미국) 150 µL로 용해시켜 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다중암세포 투과 후 조건배지내 파크리타셀의 항증식 활성

[¹⁴C]-파크리타셀 투과도 실험과 같이 트랜스웰 인서트 막의 상위 챔버에 특정 농도의 파크리타셀을 200 µL씩 주입한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 투과되어 나온 약물이 함유되어 있는 하위 챔버의 조건배지(conditioned media) 100 µL를 취하여 24시간 전에 96 웰 플레이트(1,000/웰)에 단층으로 배양해 놓은 DLD-1과 HT-29 세포에 각각 처리하였다. 대조군으로 다중암세포를 배양하지 않은 (cell free) 트랜스웰 인서트 상위 챔버에 같은 방법으로 파크리타셀을 24시간 투과 시킨 후 하위 챔버의 조건 배지도 단층세포에 처리하였다. 조건배지 100 µL가 가해진 웰에 새 배지 100 µL를 추가하고 72시간 경과 후 SRB assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다.

데이터의 분석

세포성장 억제율은 다음 (1)식을 이용하여 구하였으며 이 결과에 식 (2)의 Emax 모델을 적용하여 세포의 성장에 대한 IC₅₀ 및 저항분율(R) 등의 파라미터를 산출하였다.

% Cell Survival =

$$\frac{\text{mean absorbance of treated cells}}{\text{mean absorbance of control cells}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Cell Survival} = (100 - R) \times \left(1 - \frac{[D]^m}{K_d^m + [D]^m} \right) + R \quad (2)$$

여기에서 R은 저항 분율(residual unaffected fraction, the resistance fraction)로서 최고 약물농도에서 잔존하는 세포 생존율이다. [D]는 약물 농도, K_d는 최대세포증식 억제율(Emax=100-R)의 50%를 감소시키는 약물 농도(i.e., IC₅₀, R=0일 때), m은 Hill-type coefficient이다. 파라미터는 SigmaPlot(SYSTAT software Inc., Richmond, CA, 미국)의 Regression Wizard 기능을 이용하여 산출하였다. 통계적 유의성은 paired t-test를 수행하여 유의수준 0.05에서 판정하였다.

결 과

대장암 세포주 다중암세포(MCL)의 형태적 특징

DLD-1과 HT-29 세포를 트랜스웰 인서트의 막 위에 동일한 세포수로 5일 배양하고 다중암세포의 파라핀 절편을 만들어 형태학적 특징을 관찰하였다(Figure 1B와 1C). DLD-1과 HT-29 세포로 형성된 각 다중암세포의 두께는 각각 71.3 µm, 62.5 µm로 거의 유사하였다. 또한 hematoxylin과 eosin(H&E)으로 염색된 핵과 세포질의 경계가 뚜렷이 관찰되었

고 괴사(necrosis)부위는 관찰되지 않았다. 세공막으로부터 거리가 멀어질수록 세포의 분포 형태가 달라지는 것도 관찰되었다. 이러한 유사점 이외에 DLD-1과 HT-29의 다층암세포간에 형태학적으로 서로 구분되는 특징이 관찰되었다. 즉, DLD-1 다층암세포에서는 세공막의 근거리에 위치한 세포들이 비교적 크고 둥글며 풍부한 세포질을 가지고 성글게 분포되어 있었으며 분비선(gland) 세포들의 샘구조와 유사한 아치형태의 구조를 이루고 있었다. 세공막과 멀리 떨어진 세포들은 크기가 비교적 작으면서 길쭉한 형태로 조밀하게 분포되어 있었다(Figure 1B). HT-29 다층암세포에서는 세공막으로부터 가까이 위치한 세포들이 상대적으로 풍부한 세포들을 포함하는 것으로 관찰되었으나 세포의 크기와 형태는 거리와는 무관하게 거의 일정하게 배열되어 있는 것으로 관찰되었다(Figure 1C).

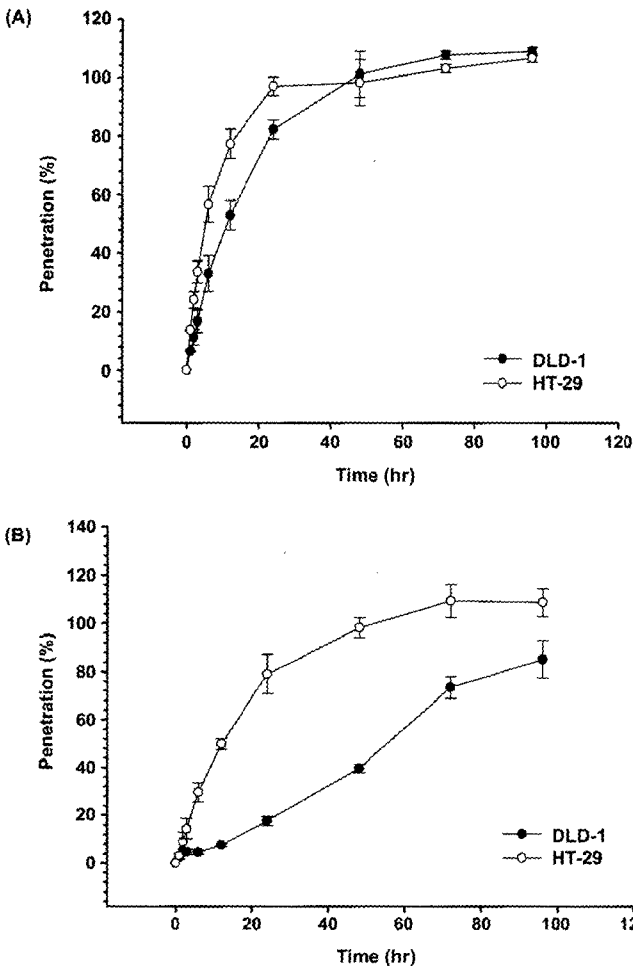


Figure 2—Penetration profile of $[^{14}\text{C}]$ -mannitol (A) and $[^{14}\text{C}]$ -paclitaxel (B). Penetration profiles were compared between MCL's of HT-29 cells (○) or DLD-1 cells (●). Data are expressed as mean \pm S.D. (n=3).

$[^{14}\text{C}]$ -만니톨 및 $[^{14}\text{C}]$ -파클리탁셀의 투과

다층배양된 DLD-1 및 HT-29 세포에서 ^{14}C 로 표지된 만니톨과 파클리탁셀의 투과 양상을 조사하였다(Figure 2). 만니톨은 세포간극으로 투과되는 대표적인 물질로서 HT-29에서는 초기부터 만니톨의 투과가 빠르게 증가하여 24시간에는 투과가 종결된 것으로 보였다(Figure 2A). 반면, DLD-1은 24시간에 82.2% 투과되어 HT-29에 비해 1.2배 투과 기울기가 작았으며 48시간에 이르러 투과가 종결되었다. 누적 투과량은 6시간에서 가장 차이가 커서 HT-29에서는 56.7%가 투과된 반면 DLD-1에서 33.1%가 투과되어 HT-29가 1.7배 빠르게 투과되었다. 두 세포주의 파클리탁셀의 투과도 역시 HT-29가 DLD-1에 비해 빠른 투과양상을 보임을 확인하였다(Figure 2B). HT-29는 24시간에 79%가 투과되고 48시간에는 98%로 완전히 투과된 것으로 보였다. DLD-1의 경우에는 24시간과 48시간에 각각 17.6%와 40%가 투과되어 동일시간 HT-29에 비해 4.5배와 2.5배 느린 투과를 보였다. 투과 종결시간인 96시간에는 85.2%만이 투과 되었다.

단층세포에서 파클리탁셀의 항증식 효과

다층배양된 DLD-1과 HT-29세포에 대한 파클리탁셀의 항증식 효과를 측정하여 약물농도-반응곡선(dose-response curve)으로 나타내었다(Figure 3). IC_{50} 은 DLD-1세포에서 약 123 nM, HT-29세포에서는 약 4.45 nM로써 DLD-1세포가 HT-29세포에 비해 30배 정도 높은 내성을 보였다. 약물농도-반응곡선에 Emax 모델을 적용하여 저항 분율(residual unaffected fraction, R), 최대세포증식 억제율(K_d), Hill-type coefficient인 m의 세 가지 파라미터를 얻었다. 이렇게 하여 산출한 R,

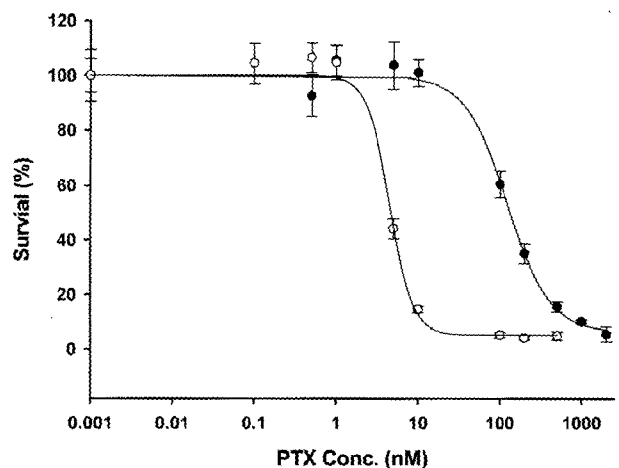


Figure 3—Dose-response curve of paclitaxel in HT-29 (○) and DLD-1 (●) cell lines. Cells were exposed to paclitaxel for 72 hr. Cell viability was determined by SRB assay. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=3).

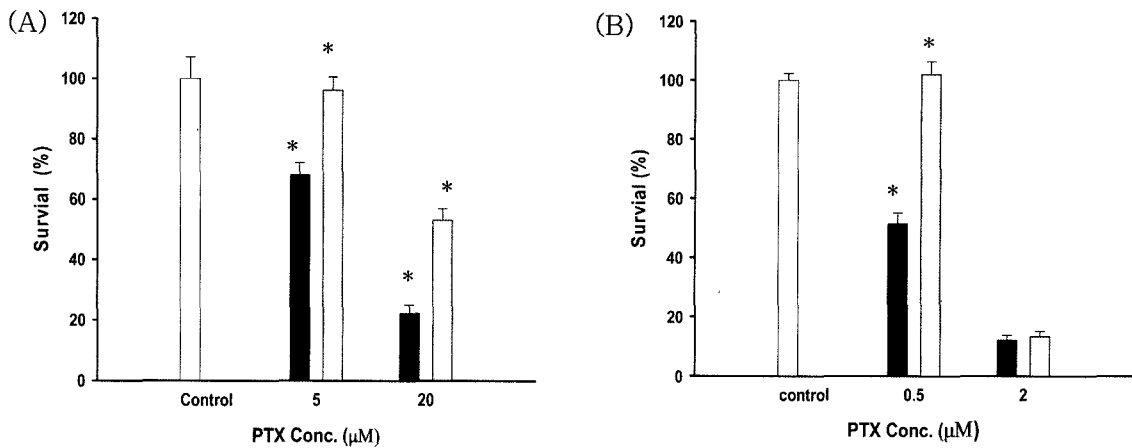


Figure 4—Antiproliferative activity of paclitaxel after penetration through 5 days old MCL's of DLD-1 (A) and HT-29 (B) cells. Paclitaxel was applied to the top chamber for 24 hr and the cytotoxicity in the conditioned media of bottom chamber was assessed after penetration through MCL (gray) or the cell free insert (black) using SRB assay. Data are expressed as mean±S.D. (n=3). (**p*<0.05)

K_d , m의 값은 DLD-1에 대해 6.25(%, 123(nM), 1.67, HT-29는 5.23(%, 4.5(nM), 3.1이었다. 이는 측정된 생존율(%) 결과로부터 조건배지 내 미지 약물농도(effective concentration, estimated)를 추정하는데 사용되었다.

다중암세포 투과 후 파크리탁셀의 활성 변화

다중암세포 투과 후 조건배지 내의 파크리탁셀의 활성 변화를 측정해 봄으로써 파크리탁셀의 다중암세포 투과도를 확인하였다(Figure 4). HT-29 다세포에서 2 μM을 부가한 경우를 제외하고는 인서트 막 자체만을 통과시킨 경우에 비해 파크리탁셀을 다중암세포에 투과시킨 경우 세포의 생존율이 증가하였다. DLD-1 다세포에서 5 μM의 경우 28%, HT-29 다세포의 0.5 μM에서 51%의 생존율 증가가 나타났고, 결과적으로 인서트 막만을 통과시킨 후 관찰된 32%와 49%의 항증식 효과는 다중암세포 투과 후 소멸되었다. DLD-1 다중암세포에서 20 μM의 경우 인서트 막만을 통과 후 나타난 항증식 효과는 78%였으나 다중암세포 투과 후의 항증식 효과는 47%로 감소하였다. HT-29 다중암세포의 2 μM 은 인서트 막만을 통과한 것과 다중암세포를 통과한 경우 생존율이 거의 유사하였다.

고 찰

본 연구에서는 대장암세포주인 DLD-1과 HT-29를 삼차원 다중암세포로 배양하고 상위 챔버에 약물을 부가하고 하위 챔버의 조건배지 내 파크리탁셀의 활성을 비교함으로써 파크리탁셀의 암조직 투과 특성을 비교 연구하고자 하였다.

정상조직에서도 약물의 조직 투과는 용이하지 않다.¹⁶⁾ 개

에서 독소루비신을 정맥주입 후 방광에서 독소루비신의 분포를 비교한 보고에 따르면 혈관 인근의 간질에서는 독소루비신이 높은 분포를 보였으나 방광조직 내에서는 고르지 못한 분포를 보였고 간질에 비해 3~10배 낮은 농도를 보였다. 또한 전립선내 국소주입(intraprostate injection) 시에도 독소루비신의 농도는 주입한 부위의 3 mm 이후에서부터 7~10배 농도 감소가 관찰되었다.¹⁷⁾

고형암 조직 내부로의 약물 수송 장애는 암의 화학요법에 큰 장애가 된다고 보고된 바 있다.¹⁵⁾ 항암제가 고형암에 대해 충분한 효능을 나타내기 위해서는 활성을 나타낼 수 있는 충분한 농도로 조직 내 모든 암세포에 도달되어야 한다. 즉 암세포에 대해 높은 항암 활성을 보이는 약물이라 하더라도 암조직을 투과하여 치료효과를 가져올 수 있는 충분한 농도로 고형암 내부에 전달되지 않으면 안된다.¹⁶⁾ 그러나 인체 고형암에서 관찰되는 불완전한 혈관분포의 특성으로 인해 혈관으로부터 원거리에 위치한 암세포들은 충분한 약물 농도에 노출되지 못한다. 인체 고형암에서 파크리탁셀과 독소루비신처럼 단백질과 강하게 결합하는 약물들은 고형암의 가장자리(periphery) 부분에서 활발히 증식하는 세포와 강하게 결합하기 때문에 오히려 약물이 내부로 전달되는데 제한을 받는 것으로 보고되었다.¹⁸⁾ 따라서 고형암에서의 효과가 탁월하고 단백질과 친화력이 높은 약물을 전달하고자 하려면 세포사멸을 유도하여 약물이 강하게 결합하는 부분의 세포 밀도를 줄여야 하며,^{3,11)} 이렇게 하여 변화된 고형암의 구조에 투과를 증진시킬 수 있는 새로운 약물투여 계획을 수립하여야 한다고 제안된 바 있다.¹⁸⁾

이전의 배양조건, 즉 24 웰 플레이트를 사용한 경우에는 DLD-1을 이용한 다중암세포가 3일에 22 μm, 8일에는

45 μm 의 두께를 형성하였다.^{10,19} 본 연구팀이 자체 제작한 다층암세포 배양계의 배양용기는 배지가 교환 가능하도록 설계되어 충분한 산소분압의 유지 및 배지의 공급이 가능하였다. 최근의 연구 결과 향상된 배양환경으로 성장속도가 2배 가량 증가하여 다층의 두께가 3일 배양 후 39.2 μm , 8일 110 μm 로 향상되었음이 확인되었다.²⁰ 다층암세포는 세포와 세포 외기질 사이에 부착반(desmosome) 포함을 비롯하여 견고연접(tight junction), adherens junction 등 인체 고형암의 생체 내 특성을 유지함으로써 생체내 환경을 가장 유사하게 재현할 수 있다고 보고된 바 있다.^{21,22} 또한 고형암의 생체 내 특성을 재현할 수 있는 또 다른 *in vitro* 실험계로써 다세포 구상체(multicellular spheroid, MCS)가 있는데²³⁻²⁷ 본 연구팀의 이전 연구에서 transmission electron microscope (TEM)을 이용하여 다세포 구상체의 내부에 세포 접합과 관련된 desmosome이 있음을 확인한 바 있다.²⁸

약물의 중앙 조직투과에 관해서는 아직 많은 연구가 되어 있지 않다. 일반적으로 물질의 투과 경로는 약물의 물리, 화학적 특성에 따라서 좌우된다. 지용성 약물의 경우 수동적 확산에 의해 세포막을 가로지르는 세포횡단(transcellular) 경로로의 투과가 가능하다. 이때 세포막수송단백질 혹은, 채널(channel), 수송체(carrier), 펌프(pump) 등이 매개한다. 반면 친수성 약물들은 세포간극의 경로를 통해 통과가 가능하며²⁹ 투과하는 분자의 크기와 전하적 상태에 따라 투과도에 제한을 받는다.³⁰ DLD-1과 HT-29의 다층암세포에서 [¹⁴C]으로 표지된 파크리타셀과 만니톨의 세포층 투과성을 비교해 보았는데(Figure 2A와 2B) 만니톨 투과는 HT-29 다층암세포에서 24시간 후 평형에 도달한 반면 DLD-1 다층암세포에서는 약 1.2배 느린 투과가 관찰되었다. 파크리타셀의 경우도 HT-29 다층암세포에서의 투과가 100%에 도달한 48시간에 DLD-1 다층암세포는 40%만이 투과되어 2.5배 정도 느린 투과를 보였고 이로부터 두 세포주간의 다층계 구조상에 투과속도를 결정하는 특성차이가 있음을 알 수 있었다.

Tannock 등은 대장암세포주 HCT-8을 이용하여 서로 다른 증진 형태의 epithelioid subline과 round variant 세포주의 다층 배양계에서 파크리타셀, 독소루비신 및 다양한 항암제들의 투과를 비교하였는데 느슨하게 증진되는 HCT-8Ra와 HCT-81R1 다세포층은 조밀하게 증진되는 HCT-8Ea와 HCT-8E11의 다세포층에 비해 항암제의 투과율이 2~6배 높다고 보고 되었다.¹⁴ 한편 H&E 염색을 통한 DLD-1과 HT-29 다층암세포의 구조적 특징을 비교해 보았을 때(Figure 1), HT-29의 다세포층은 세포간의 간격이 좁고 비교적 조밀하게 증진되어 있었고(Figure 1C), DLD-1의 다세포층은 상대적으로 느슨하게 증진되어 있음이(Figure 1B) 관찰되어 구조적

특징과 투과성은 일치하지 않았다. 따라서 파라핀으로 포매하여 얻은 절편으로는 다층암세포의 구조적 형태학적 특징을 정확히 관찰할 수 없다고 생각되며 DLD-1의 다세포 구상체에서 확인된 부착반(desmosome)은 항암제에 대해 내성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 부착반(desmosome)은 견고연접(tight junction), adherens junction과 유사하게 세포간의 접합 및 세포의 삼차원적 구조 형성에 기여하는 것으로 알려져 있기 때문에 DLD-1의 세포간 결합은 치밀할 것으로 생각되므로 이를 위해서는 HT-29 세포를 electron microscope(EM)을 이용하여 세포구조적 특징을 DLD-1과 비교해야 할 것이다.

본 연구팀의 이전 보고에서 만니톨이나 파크리타셀의 투과는 DLD-1 세포다층의 두께(배양일 수)차이에 의존적으로 관찰되었다. 또한 약물의 농도에도 의존성이 있다는 것이 관찰되었고 이러한 농도 의존성은 HT-29 세포다층에서도 관찰되었다(결과 미제시). 인간 방광암 세포주인 MGH-U1을 두께가 다른 다층으로 배양했을 때 젤시타빈의 투과는 두께가 증가할수록 감소하는 것이 보고되었다.⁶

파크리타셀을 다층암세포의 상위 챔버에 부가하여 투과된 분획과 트랜스웰 인서트 막만을 투과하여 얻은 조건배지를 각각 두 배 희석하여 조건배지 내 남아있는 항증식 활성으로서 투과율을 평가하였다(Figure 4). 미리 구한 농도-반응곡선을 이용하여 측정된 생존율로부터 조건 배지 내 유효 약물 농도를 추정해 볼 수 있었다. 즉, DLD-1 다층암세포의 다층암세포 상위 챔버에 부가한 파크리타셀이 10 μM 일 경우 생존율은 73%이며 농도-반응곡선(Figure 3)을 이용하여 조건 배지 내의 유효 약물 농도를 구할 수 있다. 이에 대해 다층암세포의 상위 챔버에 부가하여 100% 투과를 가정했을 때의 추정된 희석농도(상위 챔버 200 μL +하위 챔버 7 mL=35배 희석)의 퍼센트를 구할 수 있고 이는 투과율을 나타내게 된다. 이렇게 하여 계산된 투과율은 DLD-1 다층암세포의 5 μM 에서는 23% 또는 그 이하, 20 μM 에서는 44%이었다. HT-29 다층암세포의 0.5 μM 에서는 3.3% 또는 그 이하, 2 μM 에서는 35%로 나타났다. 즉, DLD-1과 HT-29 다층암세포의 5 μM 과 0.5 μM 의 최대 투과율은 23%와 3.3%인데 이것은 100%에 근접한 생존율을 나타냈기 때문에 농도-반응곡선상의 최고 농도를 가정하여 산출하였고 실제 농도는 그 이하 일수도 있으므로 투과율 역시 그 이하일 수 있다. 전체적으로 위의 계산된 투과율을 고려하면 DLD-1과 HT-29 다층암세포에서 파크리타셀의 투과는 50% 미만임을 확인할 수 있었고 두 세포주 모두에서 농도 의존적 경향을 나타내어 고농도에서 높은 투과율을 보였다(즉, <23% vs 44% 또는 <3.3% vs 35%). 이러한 데이터는 혈장 중 또는

간질액 중의 농도가 낮아지면 조직 투과율이 낮아지므로 조직 내 농도는 보다 크게 감소될 수 있음을 시사한다.

본 논문은 많은 문헌을 통해 *in vivo* 고형암과 유사하다고 예증된 다세포배양계를 이용하여 파크리탁셀의 암조직 투과에 대한 유용한 정보를 제공할 수 있음을 보여주었다. 첫째, 암종은 같아도 인체 고형암의 생체 내 조건과 같이 암세포가 삼차원적 구조를 형성할 때에는 구조적 또는 형태적 특징에 따라서 종양조직의 약물 투과성이 다를 수 있음을 제시하였다. 둘째, 약물의 혈장 중 농도 저하는 보다 현격한 조직 중 농도 저하를 초래할 수 있으며 반대로 혈장 중 농도를 2배 높일 경우 조직 중 농도는 2배 이상 높아질 가능성이 크다는 것을 제시한다. 따라서 약물전달 시스템 등을 이용하여 혈장 중 또는 간질액 중 약물 농도를 증가시킨다면 조직 중 약물 농도의 현격한 변화와 이에 따른 항암효능의 증진이 가능할 것이라 생각된다. 한편, 항암제의 조직농도를 높여 항암효과를 개선하기 위해서는 항암제의 조직투과도를 증진시킬 수 있는 방법 또한 모색되어야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부(F104AA010007-06A0101-00710)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) J. Parness and S.B. Horwitz, Taxol binds to polymerized tubulin in vitro, *J. Cell. Biol.*, **91**, 479-487 (1981).
- 2) E. Roussel, M.M. Belanger and J. Couet, G2/M blockade by paclitaxel induces caveolin-1 expression in A549 lung cancer cells: caveolin-1 as a marker of cytotoxicity, *Anticancer Drugs*, **15**, 961-967 (2004).
- 3) H.J. Kuh, S.H. Jang, M.G. Wientjes, J.R. Weaver and J.L. Au, Determinants of paclitaxel penetration and accumulation in human solid tumor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**(2), 871-80 (1999).
- 4) B. Desoize and J. Jardillier, Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**(2-3), 193-207 (2000).
- 5) D.S. Cowan, K.O. Hicks and W.R. Wilson, Multicellular membranes as an in vitro model for extravascular diffusion in tumors, *Br. J. Cancer Suppl.*, **27**, 28-31 (1996).
- 6) I.F. Tannock, C.M. Lee, J.K. Tunggal, D.S. Cowan and M.J. Egorin, Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **8**(3), 878-84 (2002).
- 7) L. Eikenes, O.S. Bruland, C. Brekken and C.D. Davies, Collagenase increases the transcapillary pressure gradient and improves the uptake and distribution of monoclonal antibodies in human osteosarcoma xenografts, *Cancer Res.*, **64**(14), 4768-73 (2004).
- 8) L. Eikenes, M. Tari, I. Tufto, O.S. Bruland and C.D. Davies, Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx) in human osteosarcoma xenografts, *Br. J. Cancer.*, **93**(1), 81-8 (2005).
- 9) C.H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras and A. Ostman, High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **4**(10), 806-13 (2004).
- 10) K.M. Nicholson, M.C. Bibby and R.M. Phillips, Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids, *Eur. J. Cancer*, **33**(8), 1291-8 (1997).
- 11) S.H. Jang, M.G. Wientjes and J.L. Au, Enhancement of paclitaxel delivery to solid tumors by apoptosis-inducing pretreatment: effect of treatment schedule, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**(3), 1035-42 (2001).
- 12) K.O. Hicks, S.J. Ohms, P.L. van Zijl, W.A. Denny, P.J. Hunter and W.R. Wilson, An experimental and mathematical model for the extravascular transport of a DNA intercalator in tumours, *Br. J. Cancer*, **76**, 894-903 (1997).
- 13) W.R. Wilson and K.O. Hick, Measurement of extravascular drug diffusion in multicellular layers, *Br. J. Cancer*, **79**, 1623-6 (1999).
- 14) R. Grantab, S. Sivananthan and I.F. Tannock, The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells, *Cancer Res.*, **66**(2), 1033-9 (2006).
- 15) A.I. Minchinton and I.F. Tannock, Drug penetration in solid tumours, *Nat. Rev. Cancer*, **6**(8), 583-92 (2006).
- 16) R.K. Jain, Transport of molecules in the tumor interstitium: a review, *Cancer Res.*, **47**(12), 3039-51 (1987).
- 17) C.M. Lee and I.F. Tannock, Inhibition of endosomal sequestration of basic anticancer drugs: influence on cytotoxicity and tissue penetration, *Br. J. Cancer*, **94**(6), 863-9 (2006).
- 18) J.L. Au, J.S. Hang, J. Zheng, C.T. Chen, S. Song, L. Hu and M.G. Wientjes, Determinants of drug delivery and transport to solid tumors, *J. Control. Release*, **74**(1-3), 31-46 (2001).
- 19) J.-W. Lee, Evaluation of activity of anticancer agents using multicellular layer of human cancer cells, M.S. Thesis for Medical Science, Catholic University (2003).
- 20) C.-M. Kang, Anti-proliferative effect of paclitaxel in multicellular layers of human cancer cells, M.S. Thesis for Medical Science, Catholic University (2006).
- 21) R.C. Bates, N.S. Edwards and J.D. Yates, Spheroids and cell survival, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**(2-3), 61-74 (2000).
- 22) M.T. Santini, G. Rainaldi and P.L. Indovina, Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**(2-3), 75-87 (2000).
- 23) R.M. Sutherland, W.R. Inch, J.A. McCredie and J. Kruuv, A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **18**, 491-5 (1970).

- 24) R.M. Sutherland, J.A. McCredie and W.R. Inch, Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas, *J. Natl. Cancer Inst.*, **46**, 113-20 (1971).
- 25) W.R. Inch, J.A. McCredie and R.M. Sutherland, Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture, *Growth*, **34** 271-82 (1970).
- 26) R.E. Durand and P.L. Olive, Evaluation of bioreductive drugs in multicell spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **22**(4), 689-92 (1992).
- 27) L.A. Kunz-Schughart, J.P. Freyer, F. Hofstaedter and R. Ebner, The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model, *J. Biomol. Screen.*, **9**, 273-85 (2004).
- 28) S.-H. Lee, Study on the antiproliferative activity and pharmacodynamic biomarkers of 5-FU in three-dimensional culture of human cancer cells, M.S. Thesis for Medical Science, Catholic University (2005).
- 29) L. Gonzalez-Mariscal, P. Nava, S. Hernandez, Critical role of tight junctions in drug delivery across epithelial and endothelial cell layers, *J. Membr. Biol.*, **207**(2), 55-68 (2005).
- 30) L. Jia, J. Schweizer, Y. Wang, C. Cerna, H. Wong and M. Revilla, Effect of nitric oxide on cytotoxicity of Taxol: enhanced Taxol transcellular permeability, *Biochem. Pharmacol.*, **66**(11), 2193-9 (2003).