2003 추계학술발표회 논문집
한국원자력학회

^{166}Ho과 항암제의 병용처리에 따른 체외 독성 연구

Study of Combination Treatment Effect of the ^{166}Ho and Anticancer Agents *in-vitro*

전선미, 최선주, 박경배
한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150

요 약

우리나라 전체 사망원인의 1위를 차지하고 있는 암을 치료하기 위한 여러 가지 치료법 개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 본실험은 방사선과 항암제를 병용하여 치료효과를 극대화시키고자 하는 연구의 일환으로 진행되었다. 원자력연구소의 하나로에서 생산한 동위원소인 Holmium (^{166}Ho)과 항암제를 대상으로 단독 또는 병용투여 하였을 때 *in-vitro* 상에서 cell cytotoxicity를 측정하였다. 항암제로는 Sunpla와 Methotrexate 및 Doxorubicin 이 사용되었고, cell line으로는 뇌암(T98G), 위암(MKN45), 간암(Hep3B), 난소암(NIH:OVCAR-3), 폐암(Calu6), 그리고 뇌종양(C6) 세포를 대상으로 하였다. 세포독성 실험으로는 MTT method가 수행되었다. 화학요법제 단일 투여에 따른 이들 암세포에서 IC_{50}값은 Sunpla의 경우 MKN45에서 2.4×10^{-5} M이었고, Doxorubicin은 Calu6에서 4.23×10^{-6} M로 나타났다. 단독 투여시 20%의 세포사를 일으키는 ^{166}Ho의 방사량은 10 μCi 였으며, Sunpla 및 Doxorubicin의 경우는 종양세포에 따라 다르게 나타났다. ^{166}Ho과 두 항암제의 IC_{20}을 이용하여 병용투여 했을 때 T98G, MKN45, Hep3B, 그리고 Calu6 세포에서 항암제나 ^{166}Ho의 단독투여보다 암세포 증식을 억제하는 효과가 있었다. ^{166}Ho과 항암제를 병용 투여하는 것이 암치료에 효과적임을 입증하였다.

Abstract

For the development of new controlled drug delivery systems, the application of combination therapy using radioisotopes and tumor static agents has drawn great attention. This study was designed to estimate the treatment effect of the combination therapy with Holmium (^{166}Ho) and tumor static agents. Ho-166 was produced at the KAERI using HANARO reactor. The drugs applied were Sunpla, Methotrexate and Doxorubicin. Human glioblastoma (T98G), adenocarcinoma (MKN45), hepatocellular (Hep3B), lung carcinoma (Calu6), ovary adenocarcinoma (NIH:OVCAR-3) and rat glioma (C6) were used. The cell cytotoxicity on the tumor cell lines determined by MTT assay. In the case where the chemotherapeutic agent was solely applied to the cell lines, the IC_{50} values were 2.4×10^{-5}M of the Sunpla for MKN45 and 4.23×10^{-6}M of the Doxorubicin for Calu6. The radioactivity of Ho-166 occurring 20% apoptosis was 10 μCi. As for Sunpla and Doxorubicin, the value of IC20 was dependent on the cell lines used. The combination treatment of ^{166}Ho and drug was to improve therapeutic success rate in T98G, MKN45, Hep3B, and Calu6. From this *in vitro* study it can be concluded that combining ^{166}Ho radionuclide therapy and chemotherapy could enhance the effect of each in eliminating proliferating tumor cells.

1. 서론

암세포는 세포의 발생, 성장과 분화과정에 이상이 생겼을 때 발생하게 된다. 이런 암세포들을 치료하기 위해서 수술이나 항암치료법, 방사선 치료법 등이 사용되고 있다. 항암 치료는 암세포를 죽이거나 성장을 억제하여 암세포의 전이를 방지하거나 재발을 막는 것을 목적으로 하며, 항암제 단독이나 여러 가지 약제를 병용하여 높은 치료 효과를 기대하고 있다. 그러나, 항암 치료에는 여러 신체기관에 부작용들이 있어서 많은 경우에 수술이나 방사선 치료 후 약물 치료가 시행되는데, 암 치료시에 항암요법과 방사선 치료를 병용하면 치료의 치유율을 높일 수 있다고 한다.

외부 방사성치료와 함께 platinum을 기초로 한 화합물을 병용하여 처리하면 전립선암세포에 방사선에 민감하게 반응하는 *in-vitro* 실험을 바탕으로 Cisplatin과 ^{186}Re-HEDP을 함께 처리한 경우 전립선 암세포의 증식을 제거하는 효과를 올린다는 보고가 있다[1,2]. 그리고, 새로운 암치료제로 주목받는 암세포 혈관형성 차단물질인 Angiostatin을 방사성 요법과 병행할 경우 항암효과가 전립선암, 뇌종양, 경부암 등 국부적인 암세포의 통제에 우수하다는 보고도 있다[3].

이에 본 연구에서는 방사선 요법으로는 원자력연구소 하나로에서 생산가능하고, 반감기가 26.8시간으로 비교적 짧으며, 80 keV (6.2%)의 감마선과 1.78 MeV (49%)와 1.86 MeV (51%)의 베타선을 방출하고, 베타선의 평균에너지가 0.74 MeV로써 인체조직에서 평균 베타선의 도달거리가 3mm로[4] 정상세포에는 극히 적은 영향을 미치는 ^{166}Ho을 이용하였다. 항암제로는 선플라주(Sunpla)와 메토트렉세이트 (Methotrexate), 그리고 독소루비신 (Doxorubicin)을 사용하였다. Sunpla는 국내에서 개발된 신약 1호로 허가받은 항암제로 헵타플라틴 (heptaplatin)이 주성분이며 제3세대 백금 착체 항암제이다[5,6,7]. 5-Fluorouracil과 병용하여 진행성, 전이성 또는 수술후 재발성인 위암환자의 치료에 적응시키며, 특히 한국에서 많이 발병하는 위암에 대해서는 기존의 요법과 같거나 그 이상의 항암 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. Methotrexate는 만성관절 류마티스, 영약막성 신생물, 급성 림프구성 백혈병(ALL) 등에 주로 사용하는 DHFR(Dihydrofolate reductase)를 경쟁적으로 억제하는 항대사제로서 DNA 합성 및 세포복제 과정에 사용되는 대사과정을 차단한다[8]. Doxorubicin은 악성 림프종, 소화기암, 급성골수성백혈병 등 여러 암에 사용되는 항암제로서 매우 강력한 항암제로 많이 사용된다[9]. 하지만 이들 항암제들은 각각 골수억제, 탈모증, 점막염 등 여러 부작용들을 내포하고 있다. 그래서, 이들 소량의 항암제들과 ^{166}Ho의 병용효과를 *in-vitro* 상에서 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 세포와 배양 조건

실험에 사용한 암세포는 사람의 뇌종양 세포 (T98G)와 Rat의 종양세포 (C6), 사람의 위암세포 (MKN45), 간암세포 (Hep3B), 난소암세포 (NIH:OVCAR-3) 및 폐암세포 (Calu6)이고, 이는 한국세포주은행에서 구매하여 사용하였다. 각 세포들은 37℃ Incubator (98% humidity)에서 5% CO_2 공급하에서 단층세포로 배양되었고, 배양배지의 조성은 10% FBS와 1%의 penicillin/streptomycin이 들어간 DMEM 혹은 RPMI1640 배지이다.

2.2 항암제 및 동위원소

항암제는 Sunpla, Methotrexate, 그리고 Doxorubicin을 사용하였다. 각 항암제는 PBS에 희석하여 10^{-7}-10^{-4} M 사이의 농도로 사용하였다. 동위원소로는 한국원자력연구소 하나로에서 생산되는 ^{166}Ho을 96 well당 10 μCi나 100 μCi를 넣어서 사용하였다.

2.3 세포독성 측정

단층세포로 배양된 세포들을 Trypsin 처리를 하여 바닥에서 분리하여 단일세포로 만들고, 96 well당 $1x10^5$ 세포들을 분주하고, 실험에 사용하는 항암제를 처리하여 전체부피가 200 μℓ 되도록

한 후 37℃ Incubator에서 48시간 배양시켰다. 배양이 끝난후 MTT stock solution (5 ㎎/㎖)을 well당 10 ㎕씩을 첨가한 후, 37℃ Incubator에 3시간 동안 배양한 후 배양배지를 흡입하여 전부 버린다. 이때 세포들도 같이 흡입되지 않도록 주의한다. 그리고, 0.04N HCl이 들어간 isopropanol을 100 ㎕ 첨가하여 30분간 37℃에서 방치한 후에 Spectrophotometer를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 control과 sample의 수치를 비교하여 세포의 살아있는 정도를 알아보았다.

2.4 ^{166}Ho과 단백질의 결합 비교

단백질로는 FBS를 이용하여 100% FBS, RPMI1640, 2% FBS + RPMI1640, 그리고 10% FBS + RPMI1640을 1 ml씩을 준비하여 7.5 ㎌가 되도록 ^{166}Ho을 첨가하여 1시간동안 37℃ Incubator에 보관하고, 50% TCA 100 ㎕를 첨가한 후 9000 rpm에 10분간 원심분리하였다. 이후에 총 γ-ray를 측정하고, supernatant를 제거하여 pellet의 γ선을 측정하여 비교 분석하였다.

2.5 ^{166}Ho의 방사능 측정

96 well에 적정거리를 유지하고 전체부피가 200 ㎕가 되도록 하여 여러가지 농도의 ^{166}Ho을 넣고 4시간과 48시간동안 x-ray 필름에 노출하여 방사선 사진(radiograph)을 촬영하였다. 이때 비어있는 well에 PBS buffer를 200 ㎕씩 되도록 채우거나 채우지 않고 촬영하여 필름을 비교 분석하였다.

2.6 ^{166}Ho의 의한 세포독성 측정

96 well에 사방으로 2 칸씩 떨어진 곳에서 1 x 10^5의 여러 세포들을 분주하고, 여기에 10 ㎌의 ^{166}Ho을 넣어 전체부피가 200 ㎕되도록 하여 37℃ Incubator에서 24시간 배양시켰다. 비어있는 well에는 PBS buffer로 동량의 부피만큼 채웠다. 100 ㎌의 ^{166}Ho이 들어간 plate에서는 동일한 방법으로 사방으로 3-4 well씩 멀어진 곳에 반응시켜서 세포생존정도를 알아보았다.

2.7 ^{166}Ho과 항암제의 병용처리에 의한 세포독성

2.6에서 기술한 방법으로 세포들을 분주하여 well당 10 ㎌의 ^{166}Ho을 처리하고, Sunpla와 Doxorubicin의 세포독성 결과를 바탕으로 IC_{20} 농도를 24시간동안 처리하여 MTT assay로 세포생존정도를 확인하였다.

2.8 통계처리

각 실험들은 Student's t-test를 이용하여 p value값을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 항암제의 의한 세포독성 측정

여러 항암제에 의한 세포가 살아있는 정도를 퍼센트로 하여 여러 세포에서의 결과를 알아보았다 (Fig. 1, n=3, M±SEM). 각 암세포들의 생존율을 나타내는 그래프의 기울기의 정확도와 그래프에서 얻어진 IC_{50}은 Table 1에 나타내었다. Sunpla에 의한 IC_{50} 값은 대체적으로 10^{-3}- 10^{-4} M의 높은 농도에서 구해졌고, 이는 기존에 알려진 대로 2차적인 항암제 독성이 적은 반면 항암효과가 떨어져 높은 농도의 항암제 처리를 해주어야 하는 것과 유사하다. Doxorubicin에 의한 IC_{50}값은 10^{-5}- 10^{-7} M 사이로 비교적 낮은 농도에서 구해졌는데 이는 기존에 알려진 항암제 처리의 적정 농도 (10^{-6} M)와 유사한 수치이며, 생존율을 나타내는 그래프의 기울기의 정확도가 0.9 이상으로 매우 신빙성이 높은 수치이다. 반면 Methotrexate에 의한 세포독성 실험에서는 IC_{50} 값을 구

할 수가 없었다. 여러번의 반복실험들을 행하였으나 항암제의 여러 농도에서 거의 유사한 세포독성을 나타내었다. 단 여기서 결과는 안 보이나 반응시간에 길어질수록 세포의 생존정도가 더 떨어졌을 뿐이다.

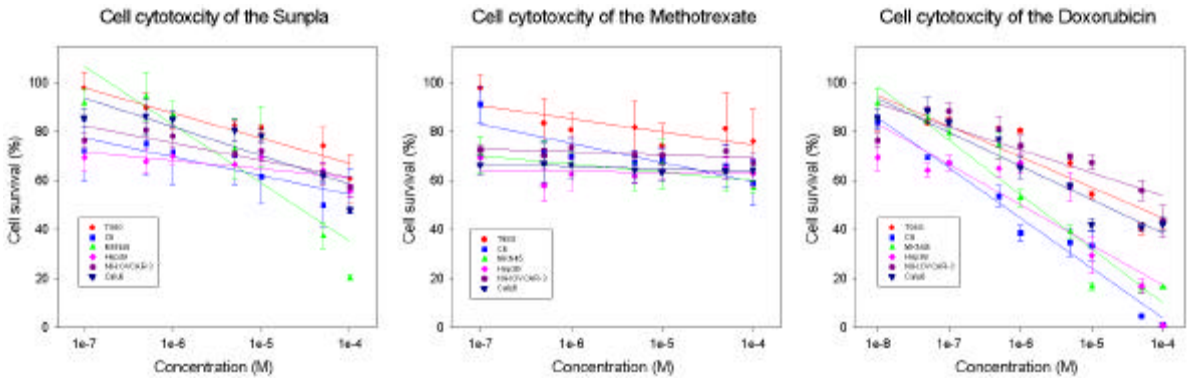


Figure 1. Cell cytotoxicity of drugs (Sunpla, Methotrexate, Doxorubicin). The cell cytotoxicity determined by MTT assay. Cells was placed in 1×10^5/well in 96-well plates. The cells were incubated for 48 h at 37℃. Data are expressed as mean percentages and SEM of survivial rate (%)(n=3).

Table 1. Effective dose (IC_{50}) of drugs.

cell line	Sunpla		Methotrexate		Doxorubicin	
	IC_{50} (M)	r^2	IC_{50} (M)	r^2	IC_{50} (M)	r^2
T98G	4.64×10^{-3}	0.9	ns	0.59	2.78×10^{-5}	0.93
C6	3.68×10^{-4}	0.81	1.63×10^{-4}	0.74	5.59×10^{-7}	0.97
MKN45	2.4×10^{-5}	0.56	ns	0.68	5.96×10^{-5}	0.94
Hep3B	0.193	0.81	ns	0.02	1.48×10^{-6}	0.99
NIH:OVCAR-3	4.23×10^{-3}	0.77	ns	0.35	2.15×10^{-5}	0.93
Calu6	5.25×10^{-4}	0.77	ns	0.66	4.23×10^{-6}	0.96

ns : non specific

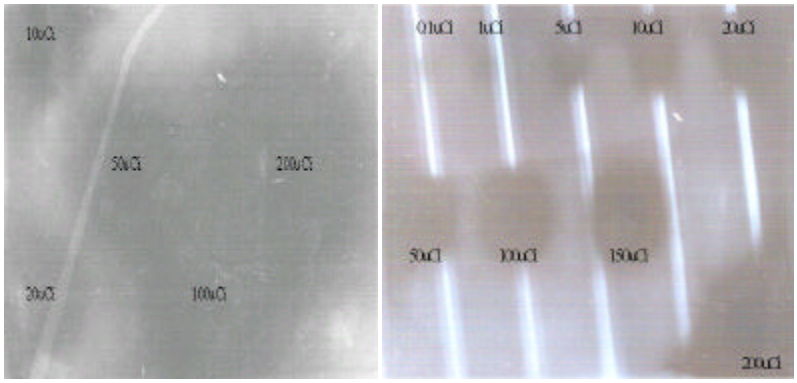
3.2 단백질과 ^{166}Ho의 결합정도

^{166}Ho은 100% FBS에서는 pellet에 42%가 남아 있었고, 배지만 있는 경우에는 1.49%, 2% FBS가 들어간 배지에서는 2.18%, 10% FBS가 들어간 배지에서는 5.71%가 pellet에 남아 있었다. 실험에 사용한 10% FBS가 들어간 배지에서는 ^{166}Ho의 94% 정도가 FBS와 결합하지 않고 배지에 존재하여 실험에 영향을 미치는 경우가 적을 것으로 판단하였다.

3.3 ^{166}Ho의 방사능측정

기존에 GafChromic 필름을 이용하여 Ho의 방사선의 흡수선량을 알아본 실험에 의하면 Ho의 β선의 침투거리는 8 mm 미만으로 나타난다고 보고하였다[4]. 여기서는 80 keV의 γ선에 대한 영향은 무시하였었다. 본 실험에서는 여러 가지 ^{166}Ho 농도별로 96 well microplate에서 넣고 4시간과 48시간 동안 x-ray 필름에 노출하여 방사선 사진 (radiograph)을 촬영하였다.

^{166}Ho에 의한 방사능은 ^{166}Ho이 들어가지 않은 빈 공간을 차폐하지 않은 경우(A)와 buffer로 차폐한 경우(B)를 비교하여 4시간동안 필름을 노출하여서 알아보았다(Fig. 2).



(A) (B)

Figure 2. Radioactivity effect of the ^{166}Ho without(A) / with(B) PBS buffer

(A)의 경우에서는 ^{166}Ho의 방사선에 의해 옆에 위치한 well에 상당한 영향을 미쳤다. (B)의 경우에 100 μCi의 ^{166}Ho을 넣은 well을 4시간 동안 필름을 노출한 경우에서는 well 크기의 1.5배 정도의 영향을 미쳤고, 48시간 동안 노출한 경우는 2배의 영향을 미쳤다. 10 μCi의 ^{166}Ho의 경우에는 48시간 동안 1.5배로 영향을 미쳤으므로 ^{166}Ho 실험에서 10 μCi는 2칸씩 떨어뜨렸고, 100 μCi에서는 3-4 칸씩 적정 떨어뜨려 적정 공간을 두고 실험을 행하였다. 96 well의 빈 공간은 PBS buffer로 차폐하여 ^{166}Ho 실험에서 γ선에 의한 영향을 최소한 줄일 수 있을 것으로 예상되어 진다.

3.4 ^{166}Ho에 의한 세포독성 시험

위의 결과를 바탕으로 적정 거리를 유지하고 well당 10 μCi와 100 μCi의 ^{166}Ho을 넣어서 세포독성 실험을 실시하였다(Fig. 3, n=3). 그 결과는 뇌암 세포인 T98G에서만 10 μCi와 100 μCi 사이에서 세포의 생존 정도의 p value값 0.0091(**)을 얻었다. 실험에 사용한 뇌암세포인 T98G는 p53이 mutation된 세포로서 뇌암 치료제 개발에 많은 연구가 되는 세포이다. 즉, ^{166}Ho을 이용한 방사선 치료는 새로운 뇌암 치료제 개발에 좋은 방법일 것이다.

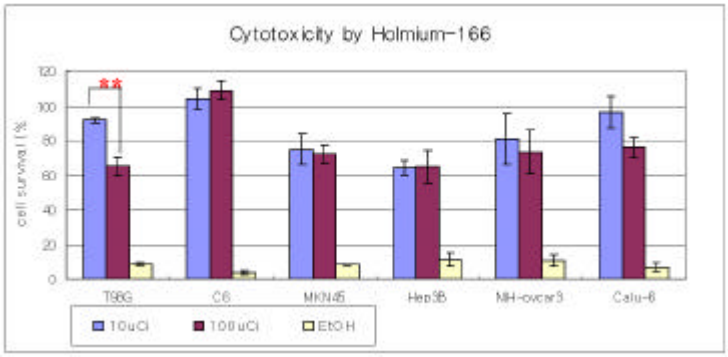
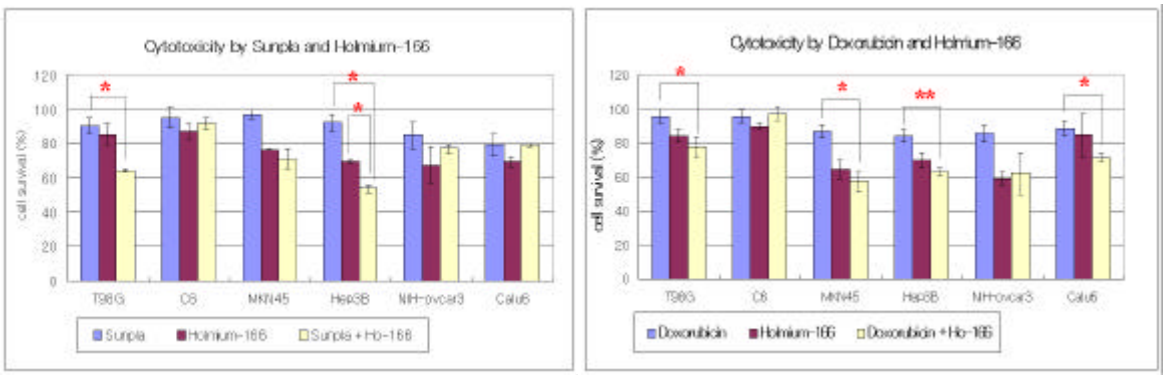


Figure 3. Cytotoxicity by ^{166}Ho. The cell cytotoxicity determined by MTT assay. Cells was placed in 1×10^5/well in 96 well plates. The cells were incubated for 24 h at 37℃. Data are expressed as percentages of survivial rate (%)(n=3, Mean ±SD, ** $p<0.01$).

3.5 ^{166}Ho과 항암제의 병용처리 효과

먼저 ^{166}Ho과 Sunpla의 단독 처리와 병용처리시 세포생존정도와, ^{166}Ho과 Doxorubicin의 단독처리와 병용처리시의 세포생존정도를 알아보았다(Fig. 4, n=3). 그림4의 A에서 보면 ^{166}Ho과 Sunpla

의 병용 처리시에는 T98G와 Hep3B 세포에서 항암제 단독투여와 병용투여 사이에서 p value 값을 0.034와 0.018으로 얻었으며, Hep3B는 ^{166}Ho 단독투여와 병용투여 사이에서도 0.018인 p value 값을 얻었다. 그림 B의 ^{166}Ho과 Doxorubicin의 병용처리시에는 T98G, MKN45, Hep3B, 그리고 Calu6 세포에서 항암제 단독투여와 병용투여사이에서 각 각 0.042, 0.014, 0.002, 그리고 0.036인 p value 값을 얻었다. ^{166}Ho만 단독 처리하는 것과 병용 처리하는 것을 비교하면 통계적으로 유의한 값을 가지지는 않았으나, 세포의 생존정도가 좀 더 병용 처리시에 떨어지는 것을 알 수가 있었다. 이는 항암제의 IC_{20}에 해당하는 낮은 농도와 방사성 동위원소인 ^{166}Ho의 적은 양을 병용 처리하여도 효과적으로 암세포를 죽이는 것으로 판단된다.



(A) (B)

Figure 4. Combination effect of the ^{166}Ho and Sunpla(A) / Doxorubicin(B). The cell cytotoxicity determined by MTT assay. Cells was placed in 1×10^5/well in 96 well plates. The cells were incubated for 24 h at 37℃. That combinated Data are expressed as percentages of survivial rate (%)(n=3, Mean ±SD, * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

4. 결론

방사성동위원소인 ^{166}Ho과 항암제를 유효한 양 (effective dose)보다 적은 양으로 병용처리하면 높은 농도의 항암요법에 의한 부작용과 많은 방사선 노출에 의한 부작용을 최소화하면서도 암세포 증식을 억제시킬 수 있다.

참고문헌

1. Geldof A.A., Slotman B.J., Radiosensitizing effect of cisplatin in prostate cancer cell lines, Cancer Lett., 101, 233-239 (1996)

2. Geldof A.A., Rooij L., Verstee호 R.T., Newling D. W.W., Teule G.J.J., Combination 186Re-HEDP and cisplatin supra-additive treatment effects in prostate cancer cells, J. Nucl. Med., 40(4), 667-671 (1999)

3. Mauceri H.J., Hanna N.N., Beckett M.A., Gorski D.H., Staba M.J., Stellato K.A., Bigelow K., Heimann R., Gately S., Dhanabal M., Soff G.A., Sukhatme V.P., Kufe D.W., Weichselbaum R.R., Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy, Nature, 396, 287-291 (1998)

4. 강해진, 조철우, 박찬희, 오영택, 전미선, 김영미, 박경배, GafChromic 필름을 이용한 Ho-166의 혈관내 방사선조사를 위한 선량분포 측정, 의학물리, 10(3) (1999)

5. Cho YB, Kim KH, and Kim DK, Pharmacokinetics, Tissue distribution, and excretion of cis-malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum(II)in dogs, Drug Metab Dispos., 23(11), 1280-1285 (1995).
6. Chung MK, Kim JC, Roh JK, Embryotoxic effects of SKI 2053R, a new potential anticancer agent, in rats. Reprod Toxicol. 12(3), 375-381 (1998)
7. Hong WS, Kim HT, Kim KH, Kim DK, In vitro antitumor activity of a new platinum complex, cis-malonato [(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane] platinum (II) (SKI 2053R), against human lung and stomach cancer cell lines, Anticancer Res., 15(1), 51-54 (1995)
8. A. Baroja, C. Hoz, A. Alvarez, R. Vielba, R. Sarrat, J. Arechaga and J. Gandarias, Polyploidization and exit from cell cycle as mechanisms of cultured melanoma cell resistance to methotrexate, Life Sciences, 62(25), 2275-2282 (1998)
9. S. Gamen, A. Anel, P. Lasierra, M. A. Alava, M. J. Martinez-Lorenzo, A. Pineiro and J. Naval, Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way, FEBS Lett., 417(3), 360-364 (1997)