

1,2-비스 (디페닐포스피노)에탄을 배위자로 한 항암성백금 (II) 착체의 위암세포와 정상신장세포에 대한 선택적 세포독성

노영수 · 장성구* · 정지창**

경희대학교 약학대학, *의과대학

(Received June 15, 2000)

Selective Cytotoxicity of Pt (II) Complex Containing 1,2-Bis (diphenylphosphino)ethane on Human Gastric Cancer Cell-Lines and Normal Kidney Cells

Young-Soo Rho, Sung-Goo Chang* and Jee-Chang Jung**

College of Pharmacy and *Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract — We have synthesized a novel platinum (II) coordination complex containing trans-1,2-diaminocyclohexane (DACH) as a carrier ligand and 1,2-bis (diphenylphosphino)ethane (DPPE) as a leaving group. In addition, nitrate was added to improve the water-solubility. A new series of [Pt (trans-1-DACH) (DPPE)]·2NO₃ (PC) was evaluated for its cytotoxic activity on MKN-45 human gastric adenocarcinoma cells and normal primary cultured kidney cells. PC has demonstrated high levels of cytotoxicity against MKN-45/S, MKN-45/ADR and MKN-45/CDDP cells. The cytotoxicity of PC against rabbit proximal renal tubular cells, human renal cortical cells, and human renal cortical tissues, determined using the MTT assaying technique, the [³H]-thymidine uptake and the glucose consumption tests, was found to be quite less than those of cisplatin. Based on these results, this novel platinum (II) coordination complex appears to be better for improving antitumor activities with low nephrotoxicity and is a valuable lead in the development of new, clinically available anticancer chemotherapeutic agents.

Keywords □ Selective cytotoxicity, platinum (II) coordination complex, antitumor activity, nephrotoxicity.

Rosenberg^{1,2)}에 의하여 항암성 백금 (II)착체의 하나인 cisplatin(CDDP)은 *in vitro* 항암효과가 규명된 후, 고환암, 난소암, 방광암등의 고형암에 임상적용되고 있으며 특히 고환종양에 있어서는 치료효과가 우수하고 그 외에도 골육종, 식도암, 전립선암 등에서도 효과가 인정되고 있다.³⁾ 그러나 CDDP는 강한 신독성, 오심, 구토, 내이신경독성등의 부작용을 수반하고 조직내 축적효과가 있는 것으로 알려져 사용에 제한을 받고 있다.^{4,5)}

CDDP의 독성증 가장 문제시되고 있는 신독성은 용

량증가에 따른 독성증가 현상⁶⁾으로 신피질에 직접적으로 독성을 나타내고⁷⁾ 원위 세뇨관과 집합관에도 손상을 주기는 하나 근위 세뇨관에 가장 심한 영향을 주는 것으로 알려져 있다.⁸⁾

특히 신장독성은 CDDP 항암화학요법에 있어 현재도 가장 큰 어려움으로 지적되고 있으며, 특히 CDDP의 고용량요법으로 훨씬 효과적인 항암효과를 기대 할 수 있으나 심한 신독성으로 임상응용에 어려움이 있다. 또한 앞서 지적한 바와 같이 오심, 구토, 신경독성, 청각장애등의 부작용과 투여후 혈장 단백질과의 높은 결합으로 인한 생체이용률의 저하 및 반복 투여에 의한 내성 암세포의 출현⁹⁾ 등으로 새로운 항암성 백금착체개발의 필요성이 대두

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0290 (팩스) 02-966-3885

되고 있다.

CDDP를 비롯한 백금착체는 여러 가지 구핵시약에 대해서 치환가능한 배위자(leaving group)와 치환불활성인 배위자(carrier ligand) 및 중심금속(Pt)으로 구성되는데 carrier ligand는 항암효과의 강도 및 항암 spectrum에 관계하며 leaving group은 수용성, 안정성, 반응성에 영향을 미친다.¹⁰⁾ 유효한 carrier ligand로서 1,2-diaminocyclohexane(이하 DACH)을 배위자로 하는 백금착체가 항암활성이 있는 것으로 보고 되어 있고,¹⁰⁾ leaving group도 항암활성에 중요한 영향을 미치는 요인으로 작용하고 있으며 생체내에 투여된 백금착체는 세포막을 투과한 후 leaving group이 가수분해를 받아 이탈되고 이 배위부위가 암세포의 DNA와 결합하여 복제를 억제함으로써 항암활성을 나타내게 되어 결국, 백금착체의 항암활성은 생체내에서 leaving group의 치환속도에 관계된다고 할 수 있다.

DACH를 carrier ligand로 한 백금착체의 항암성에 대하여 Kidani¹²⁾는 trans-*l*-체, trans-*d*-체, cis체의 각 이성체중 trans-*l*-DACH만을 선택하여 leaving group으로서 oxalic acid와 malonic acid등을 반응시켜 각각 Pt(oxalato) (trans-*l*-DACH) [oxaliplatin]와 Pt(malonato) (trans-*l*-DACH)[1-PHM]을 합성하였으며 이중 임상시험중에 있는 oxaliplatin은 비교적 독성이 적고 안정한 것으로 알려져 있다.

이미 Jung¹³⁾은 carrier ligand로 cis-DACH를, leaving group에 diphosphine류를 도입한 백금(II)착체를 human ovarian adenocarcinoma cell-lines에 대한 *in vitro* 항암효과와 토끼 및 인체신장의 일차배양 세포에 대한 *in vitro* 세포독작용을 CDDP와 비교검토한바 항암활성은 CDDP와 유사한 반면에, 정상신장세포독성은 CDDP에 비하여 현저히 감소된 백금(II)착체임을 확인한 바 있다.

이에 본 연구자들은 신독성을 감소시킨 새로운 백금착체를 개발함으로써 항암성 백금착체의 문제점을 극복할 목적으로 carrier ligand로서 DACH의 trans-*l*-체를, leaving group으로서는 1,2-bis-(diphenylphosphino)ethane(DPPE)을 사용하여 합성한 백금(II)착체인 [Pt(trans-*l*-DACH) (DPPE)]·(NO₃)₂를 *in vitro*에서 인체의 위암세포에 대한 항암활성과 인체 및 토끼 신장세포와 신조직에 대한 세포독성을 검토한 바 유의한 결과를 얻었다.

실험방법

실험재료 - 이 연구에 사용된 백금(II) 착체로는 carrier ligand에 trans-*l*-체의 1,2-diaminocyclohexane(DACH)을, leaving group에는 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane(DPPE)을 배위자로 하여 합성한¹⁴⁾ [Pt(trans-*l*-DACH) (DPPE)]·(NO₃)₂ <PC>로서 물에 잘 녹는 미황색 결정성 분말이며, 이 실험에는 생리식염수에 용해하여 사용하였다. Insulin, transferrin, hydrocortisone, prostaglandin E1, triiodothyronine, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 및 기타 시약은 Sigma Co.의 제품을 사용하였으며, DMEM과 RPMI medium, soybean trypsin inhibitor 및 fetal bovine serum(FBS)는 Life Technology(Grand Island, NY)로부터, collagenase IV는 Worthington(Freehold, NY)의 제품을 사용하였다. Iron oxide는 Cook과 Pickering¹⁵⁾의 방법에 따라 제조한 iron oxide 표준용액을 사용하기전에 phosphate buffered saline(PBS)으로 희석하여 실험에 사용하였다.

실험동물 및 암세포주 - 실험에 사용한 동물은 체중 1.8~2.0 kg의 숫토끼를 사용하였다. 사료는 삼양유지 사료(주)의 고품사료로 사육하고, 충분한 물을 공급하면서 온도와 습도가 조절된 사육실에서 2주간 실험환경에 순응시킨 후 사용하였으며, 실험은 23±2°C에서 실시하였다. 암세포주는 인체 위암 세포주인 MKN-45 human gastric adenocarcinoma cell-line은 wild type 세포주(MKN-45/S), adriamycin 내성세포주(MKN-45/ADR)와 CDDP 내성 세포주(MKN-45/CDDP)를 원자력 병원 세포생물학 연구실로부터 냉동상태로 분양 받았으며, RPMI배지에 10% FBS를 첨가한 배양액으로 계대배양하여 사용하였다.

토끼의 근위세뇨관 상피세포의 배양 - Jung¹⁶⁾의 방법에 준하여 체중 1.8~2.0 kg의 토끼를 cervical dislocation에 의하여 치사시킨 다음, 신동맥을 보존한 채 신장을 적출하였다. 신동맥을 통하여 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)을 주입하여 세척한 다음, DME/F12(1:1 pH 7.4) medium에 넣은후 Dounce homogenizer(type B pestle)로 homogenize시켰다. Homogenate를 253 μm mesh filter에 통과시키고 83 μm mesh filter에 모아진 세뇨관과 사구체를 DME/F12 medium에 옮긴 다음 사구체는

magnetic stir bar를 사용하여 제거하였다. 그 직후 soybean trypsin inhibitor(0.025%)와 collagenase (0.125 mg/ml)를 넣어 2분간 실온에서 incubation한 후, insulin(5 µg/ml), transferrin(5 µg/ml) 및 hydrocortisone(5×10^{-8} M)을 첨가한 DME/F12 medium에 부유시켜 일정량씩 배양접시에 접종하고 5% CO₂ incubator에 37°C로 2주간 배양하였다.

인체의 정상 신피질 세포의 배양 - Jung¹⁶⁾ 등의 방법을 변형하여 실험하였다. 먼저, 신장암으로 근치적 신장 절제술을 받은 환자로부터 정상신장조직을 취하고, penicillin G 및 streptomycin을 함유하는 DME/F12(pH 7.4) medium으로 수회 세척하여준 다음, renal capsule을 제거하고 mess를 사용하여 신피질만을 얇게 잘라준 후 무균상태하에서 homogenize하여 일정량의 DME/F12(pH 7.4) medium에 부유시키었다. Trypsin inhibitor와 collagenase(10 mg/ml)을 0.2 ml씩 넣고 2분간 실온에서 배양한 후 1%의 FBS를 함유한 DME/F12 medium에 부유시키어 배양접시에 접종하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2주간 배양하였다.

MTT assay - 토끼 및 인체의 신장세포와 암세포주를 DME/F12 및 RPMI media 20 ml에 각각 이식하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이식한지 제3일에 1000 rpm에 5분간 원심분리하여 세포를 모은 다음 배지를 교환하였다. 세포 증식기인 제4일에 다시 배지를 교환한후 10⁶ cell/ml 농도로 희석하고, 합성된 백금(II)착체를 5 µM농도~500 µM 농도로 만들었다. 96well titer plate에 세포 희석액 0.1 ml 및 각종 농도의 검체 0.1 ml을 가하고 48시간 동안 배양하였다. 배양액속에 2 mg/ml농도의 MTT용액 0.05 ml/well을 가하여 실온에서 2분간 방치하여 생성된 침전물을 용해시킨 다음 ELISA Reader로 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교 약물로는 cisplatin을 사용하였고 검체없이 동일한 조건하에서 배양된 세포군을 대조군으로 하였다.¹⁷⁾

³H-Thymidine incorporation실험 - Primary culture 하여 7일에서 10일이 경과된 토끼 신장의 근위세뇨관 상피세포 및 인체의 정상 신피질세포를 24well plate에 각 well당 10⁶개씩 접종하고 1시간 동안 배양하였다. 다시 여기에 각 well당 50 µM되도록 백금 (II)착체를 가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 1 µCi/ml농도의 ³H-thymidine을 가

한 다음 다시 24시간동안 배양하고 trypsin처리하여 모은 세포를 10% trichloroacetic acid 및 PBS으로 세척한 다음, 0.5 M NaOH를 가하여 37°C에서 2시간 동안 solublize 시키고 0.5 M HCl로 중화시킨후 scintillation cocktail 10 ml이 함유된 scintillation vial에 0.1 ml씩 옮겨 β-counter(Beckman, LS 5000 TD)로 측정하였다. 비교 약물로는 cisplatin을 사용하였으며 검체없이 동일한 조건으로 배양한 세포를 대조군으로 하여 100% thymidine섭취율로 하였고, 각 검약에 따른 thymidine섭취율로부터 세포의 생존율을 구하였다.

Glucose consumption실험 - 삼차원으로 조직배양된 인체의 정상 신피질 조직을 cisplatin 및 백금 (II) 착체에 24시간, 48시간, 72시간 동안 노출시키고, 각각의 실험군을 PBS로 3회 세척한 뒤 정상 MEM을 공급하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양시킨 후 다시 MEM을 교환하고 glucose의 소모량을 측정하였다. 다시 10 µl의 배양액을 첨가한 뒤 2차 흡광도를 구하여 포도당의 농도를 산출하였으며 각 well의 포도당 농도는 3회씩 반복 측정 하였다. 72시간의 포도당 농도를 측정하여 변화를 관찰하였으며, 이 72시간 동안의 변화를 1주기(period)로 하였고 이러한 변화는 Sigma plot 컴퓨터 프로그램(Jandal Scientific, Corte, Madera CA)으로 도식하였으며 동시에 Statgraphics프로그램을 이용하여 포도당의 반감기를 측정하였다. 이러한 포도당 농도의 측정은 실험하고자 하는 각 well을 3주기 동안 반복 측정하여 실험전 포도당의 반감기를 정상대조군으로 하였으며 검액 투여후에도 3주기 동안의 포도당 소모량을 측정하여 반감기를 계산한 뒤 약물 처치후에 발생된 반감기의 연장정도를 수치로 나타내었다.¹⁸⁻²⁰⁾

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치±표준오차로 표시하고 각 군간의 비교는 Student's t-test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 P<0.05일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

In vitro 항암효과

인체 위선암세포주인 MKN-45세포의 감수성형 (MKN-45/S)에 대한 PC의 항암효과는 Table I에 나타난 바와 같이 평균 세포독성 농도(CC₅₀)가 19.8

Table I – *In vitro* cytotoxicities of Pt(II) complexes on MKN-45 human gastric adenocarcinoma cell-lines

Compounds	CC ₅₀ (μ M)		
	MKN-45/S ^{a)}	MKN-45/ADM ^{b)}	MKN-45/CDDP ^{c)}
Cisplatin	21.5 \pm 3.52 ^{d)}	24.7 \pm 4.26	127.0 \pm 14.65
PC ^{e)}	19.8 \pm 2.76	25.4 \pm 3.83	49.8 \pm 7.17*

CC₅₀ indicates mean cytotoxic concentration with MTT assay, ^{a)} wild type cell, ^{b)} adriamycin-resistant cell, ^{c)} cisplatin-resistant cell, ^{d)} Values are mean \pm S.E., ^{e)} [Pt(II)(trans-*t*-DACH)(DPPE)(NO₃)₂]

*Significantly different from cisplatin-control (P<0.05).

μ M로서 항암활성 대조약물인 CDDP와 대등한 세포독성효과를 나타내었으며, adriamycin 내성 세포주인 MKN-45/ADR에 대하여도 CDDP와 유사한 활성을 나타내었다.

Cisplatin에 내성을 나타내는 MKN-45/CDDP 세포에 있어서는 CDDP의 모든 농도에서 항암활성이 감수성형에서 보다 저하되어 있었으나 새로 합성된 백금착체류에는 별다른 내성을 보이지 않고 감수성 세포에서와 유사한 항암활성을 유지하였다.

신장 세포독성

토끼의 근위세뇨관 상피세포에 대한 독성 – MTT assay방법에 의한 토끼의 근위세뇨관에 대한 세포독성은 Table II에 제시한 바와 같다. 토끼 근위세뇨관 상피세포에 대한 PC의 평균세포독성농도(CC₅₀)는 224.7 μ M로서 cisplatin의 23.2 μ M에 비하여 유의하게 (p<0.001) 낮은 독성을 보였다.

³H-Thymidine incorporation실험에 의한 토끼의 근위세뇨관 세포에 대한 독성은 Table III에 나타난 바와 같이 cisplatin의 세포내 uptake rate(6.6%)에 비하여 PC의 세포내 uptake rate는 54.7%를 나타내는 등 검체 투여군에서 세포내 thymidine uptake rate가

Table II – *In vitro* cytotoxicities of platinum complexes on proximal tubular cells of rabbit kidney

Compounds	CC ₅₀ (μ M)	Ratio ^{a)}
Cisplatin	23.2 \pm 3.40 ^{b)}	-
PC ^{c)}	224.7 \pm 28.07*	9.69

^{a)} The ratio is the CC₅₀ of the PC divided by that of the cisplatin, ^{b)} Values are mean \pm S.E., ^{c)} [Pt(II)(trans-*t*-DACH)(DPPE)(NO₃)₂]

*Significantly different from cisplatin-control(P<0.001).

Table III – Effect of platinum(II) coordination complexes on ³H-thymidine incorporation into primary cultured proximal tubular cells of rabbit kidney

Compounds	[³ H]-thymidine uptake	Uptake rate (%)
Control	541.7 \pm 70.53 ^{a)}	100.0
Cisplatin	35.5 \pm 42.35	6.6
PC	296.2 \pm 37.60	54.7

Concentration of platinum(II) coordination complexes in culture medium; 5 \times 10⁻⁵ M, ^{a)} Values are means \pm S.E., ^{b)} [Pt(II)(trans-*t*-DACH)(DPPE)(NO₃)₂]. All the incorporations were determined in triplicate.

Table IV – *In vitro* cytotoxicities of platinum complexes on cortical cells of human kidney

Compounds	CC ₅₀ (μ M)	Ratio ^{a)}
Cisplatin	20.8 \pm 3.84 ^{b)}	-
PC ^{c)}	251.3 \pm 32.75*	12.08

^{a)} The ratio is the CC₅₀ of the PC divided by that of the cisplatin, ^{b)} Values are mean \pm S.E., ^{c)} [Pt(II)(trans-*t*-DACH)(DPPE)(NO₃)₂].

*Significantly different from cisplatin-control (P<0.001).

월등히 높아, 새로운 백금착체는 토끼신장세포에 대한 세포독성이 현저히 낮았다.

인체의 정상신피질세포에 대한 독성 – 인체의 정상신피질세포에 대한 세포 독성은 Table IV에 나타난 바와 같이 CDDP 대비 1/12.08을 나타냄으로써 CDDP의 세포독성 보다 현저히 낮았다. 인체의 정상신피질세포에 대한 각 검체의 ³H-thymidine uptake 정도가 PC에서 34.9%로서 CDDP uptake rate 6.8%에 비하여 유의하게(p<0.001) 높게 나타나 인체의 신장세포에 대한 독성이 CDDP에 비하여 유의하게 낮았다(Table V).

인체의 정상신장조직에 대한 독성 – 인체의 정상신장

Table V – Effect of platinum(II) coordination complexes on ³H-thymidine incorporation into primary cultured renal cortical cells of human kidney

Compounds	[³ H]-thymidine uptake	Uptake rate (%)
Control	565.4 \pm 72.38 ^{a)}	100.0
Cisplatin	34.9 \pm 5.70	6.8
PC ^{b)}	342.3 \pm 42.65	60.5

Concentration of platinum (II) coordination complexes in culture medium; 5 \times 10⁻⁵ M, ^{a)} Values are means \pm S.E., ^{b)} [Pt(II)(trans-*t*-DACH)(DPPE)(NO₃)₂].

All the incorporations were determined in triplicate.

Table VI – Change of glucose half-life on histocultured renal cortical tissue specimens that were treated with 10^{-4} M cisplatin and 10^{-4} M experimental drug (PC) for 72 hours exposure

Compounds	Glucose Half-Life (Hours, M \pm S.E)						
	1	2	3	4	5	6	7(period)
Cisplatin	58.4 \pm 7.02	60.7 \pm 6.54	61.5 \pm 7.28	325.6 \pm 39.05	356.2 \pm 41.19	331.7 \pm 44.50	307.6 \pm 36.85
PC ^{a)}	54.9 \pm 6.45	53.7 \pm 5.90	59.2 \pm 7.54	63.1 \pm 8.52**	71.4 \pm 8.67**	70.8 \pm 9.25*	71.5 \pm 8.06*

One period constitutes 3 days, all experimental histocultures had their own control that was pretreatments three period, glucose half-life on control specimen was very steady. a) : [Pt(II)(trans-*l*-DACH)(DPPE)(NO₃)₂]

*Significantly different from cisplatin-control (*P<0.05, **P<0.01)

조직에 대한 포도당소모량의 측정에 의한 신장조직 독성 결과는 Table VI에 나타난 바와 같이 검체 처리후 인 4 period에 CDDP는 포도당 반감기의 급격한 증가를 지속한 반면에 PC투여군에서는 4 period이후 7 period에 이르기까지 별다른 변화가 없었다. 이와같은 현상은 토끼 및 인체의 일차배양된 정상신장세포에 대한 MTT assay와 ³H-thymidine incorporation의 실험결과와 일치되는 경향을 나타내었다.

고 찰

백금 (II)착체는 항암활성의 강도와 항암 spectrum을 결정짓는 carrier ligand와 수용성, 안정성, 반응성에 영향을 주는 leaving group 및 중심 금속인 Pt로 구성되며, 이들 carrier ligand와 leaving group을 여러 물질로 바꿔줌으로써 많은 백금화합물을 얻을 수 있다. 유효한 carrier ligand의 하나로서 DACH는 cis, trans-*l* 및 trans-*d*체로 분리될 수 있고, 이들로부터 합성된 백금착체중에서 trans-*l*-DACH의 항암활성이 가장 높으며 cis-DACH의 신독성이 가장 낮은 것으로 알려져 있다.^{10,11)}

CDDP를 위시한 백금 (II)착체의 신장독성에 대한 구체적인 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않으나, 신장 혈류의 저해설이나 신장내 sulfhydryl group의 감소를 주장하는 연구자도 있는바, 이 실험에서 밝혔듯이 신장혈류와 관계없는 *in vitro*에서 proximal tubule cell 또는 신장조직 자체가 손상을 받는점으로 미루어 신장혈류장애 이외의 원인이 있을것으로 생각된다.²¹⁾

CDDP에 의하여 일어나는 신장의 손상부위에 관한 연구로서 Dobyan 등⁴⁾은 distal tubule의 S3 segment에 많은 변화가 일어남을 관찰한 바 있고, Gonzalez-Vitale등²⁴⁾은 인체 신조직을 이용한 연구에서 주된 병변이 distal tubule에 일어남을 보고하고 있으며,

proximal tubule과 distal tubule에 모두 손상이 생긴다는 주장도 있다.²⁵⁾ 이러한 신독성을 줄이기 위한 방법으로 CDDP의 투약 전후 충분한 수분의 공급이나 mannitol 그리고 WR-2721과 같은 sulfhydryl의 투여 뿐만 아니라 diethyldithiocarbamate를 투여한 보고들이 있다.²⁶⁾

CDDP에 의한 신장의 병소가 어느 부위이든 간에 CDDP의 신독성은 임상적으로 많은 문제를 유발하여 충분한 항암 효과를 기대하기 위한 고용량의 치료가 불가능하게 되어, 많은 연구자들에 의하여 CDDP에 버금가는 항암 효과와 아울러 독성이 적은 약물의 개발에 노력하게 되었다. 이러한 연구의 결과 임상적으로 사용되는 대표적인 약제가 carboplatin이다. 그러나 이 carboplatin은 신독성이나 신경독성은 경감시킨 반면 골수억제 현상이 강하게 나타나는 문제점이 제기되고 있다.²⁷⁾

본 실험 약제의 신장 독성을 측정하기 위한 *in vitro* 실험방법인 조직 배양이나 primary culture는 이미 공인된 바 있다. 즉 조직 배양은 Freeman과 Hoffman²⁸⁾이 개발한 소위 콜라겐 겔을 이용하여 암 조직을 생체내의 상태와 거의 비슷한 정도로 조직 배양할 수 있다는 삼차원적 조직 배양법을 제시한 바 있고, Chang 등¹⁸⁾은 인체 신 피질 조직에 대하여 콜라겐 겔에 조직 배양을 시도하여 6개월간의 지속적 계대 배양과 자가방사 기록법 및 전자 현미경적 소견, 조직화학 염색법을 통하여 그 어느 방법보다 인체 상태에 가까운 조직 배양법임을 입증한 바 있다.

이 연구에서도 조직 배양한 인체 신 피질 조직의 포도당 소모량이 일정한 소견을 보이다가 약제 투여 후 농도에 따라 상이하게 발현됨으로써 포도당 소모량의 변화와 약제의 조직 독성이 상호 연계되어 나타남이 관찰되었다.

토끼신장의 근위세뇨관 상피 세포의 primary culture는 Chung등²⁹⁾에 의하여 최초로 보고된 바 있

으며 본 연구에서도 동일한 방법으로 토끼 및 인체신장 세포의 primary culture를 시행하여 이들 세포에 대한 세포독성을 측정하였으며, 이 실험방법의 장점은 hormonally defined medium을 사용하기 때문에 섬유아세포의 증식을 방지할 수 있는 것이다. 조직 배양된 인체 신장조직에서의 포도당 소모량의 측정 결과와 primary culture한 인체 및 토끼의 신장세포에서 MTT assay를 통한 세포 독성 검사의 결과가 상호 일치하는 것은 본 연구의 적정성을 의미한다 하겠다. 즉, 대조약물인 CDDP는 histoculture한 세포배양에서도 아주 강한 세포독성을 보였다.

*In vitro*에서의 항암효과 판정은 일반적으로 암세포주에 대한 cytotoxicity index(CI)로서 표현하며, CI 50%이상을 항암효과 positive로 판정하고 있다. 이 실험에 사용된 백금(II)착체는 MKN-45 human gastric adenocarcinoma cell-lines에 대하여 검체의 모든 농도에서 CDDP와 대등한 항암활성을 보였으며, 특히 CDDP에 저항성이 형성된 MKN-45/CDDP에 대하여 항암활성이 우수하였다. 새로이 합성한 백금(II)착체는 CDDP에 비하여 현저히 낮은 신독성을 나타내었다. 이것은 CDDP의 carrier ligand인 diamine을 DACH로 치환시켰고, leaving group을 2분자의 Cl대신에 DPPE로 치환시킴으로써 보다 우수한 항암효과와 아울러, 신독성의 감소를 보이는 것이 아닌가 여겨진다.

*In vitro*에서의 신독성을 측정하는데 Mortine과 Borch³⁰⁾는 돼지신장의 근위세뇨관 상피세포인 LLC-PK1을 CDDP에 의한 신독성을 측정하는데 좋은 model이 된다고 한 바 있으나, 이 실험에서는 primary culture cell을 이용함으로써 cell line에 비하여 보다 좋은 data를 얻을 수 있었다. 더욱이 human kidney tissue를 이용한 glucose consumption시험은 거의 *in vivo*에서의 상태를 유지하는 collagen gel을 이용한 three dimensional culture method에 따라 얻어진 결과이므로 renal cortex에 대한 반응으로 볼 수 있으며, 앞으로 신독성의 index를 결정하는데 있어서 토끼신장의 근위세뇨관 상피세포와 인체신장피질 세포의 primary culture cell과 함께 인체의 신장조직배양법을 활용하는 것이 바람직 할 것으로 생각된다.

결 론

Trans-*J*-DACH 및 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane

(DPPE)을 배위자로하는 새로운 항암성 백금(II)착체(PC)는 CDDP와 비슷한 항암활성을 보인 반면, 토끼와 인체의 신피질 세포와 인체의 신피질 조직에 미치는 독성이 현저히 저하되었다는 점을 미루어, 새로운 백금(II)착체 [Pt(II)(trans-*J*-DACH)(DPPE)] · 2NO₃는 앞으로 다각적인 연구를 계속할 필요성이 있으며, 향후 새로운 항암화학요법제로 개발될 가능성이 있을 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Rosenberg, B., Van Camp, L. and Thomson, A. J. : The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum complexes. *J. Biol. Chem.* **242**, 1347 (1967).
- 2) Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J. E. and Mansour, V. H. : Platinum compounds : A new class of potent antitumor agents. *Nature* **222**, 385 (1969).
- 3) Rosenberg, B. : Platinum complex-DNA interactions and anticancer activity. *Biochimie* **60**, 399 (1978).
- 4) Dobyán, D.C., Levi, I. and Jacobs, C. : Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **213**(3), 515 (1980).
- 5) Ward, J. M., Young, D. M., Fauvie, K. A., Wolpert, M. K., Davis, R. and Guarino, A. M. : Comparative nephrotoxicity of platinum cancer chemotherapeutic agent. *Cancer Chemother. Rep.* **60**, 1675 (1976).
- 6) Gottlieb, J. A. and Drewinko, B. : Review of the current clinical status of platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Rep.* **59**, 621 (1975).
- 7) Krakoff, I. H. : Nephrotoxicity of cis-diaminedichloroplatinum(II). *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1523 (1979).
- 8) Walker, E. M. and Gale, G. R. : Methods of reduction of cisplatin nephrotoxicity. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **11**, 397 (1981).
- 9) Burchenal, J. H., Kalaher, K., O'Toole, T. and Chisholm, J. : Lack of cross-resistance between certain platinum coordination compounds in mouse leukemia. *Cancer Res.* **37**, 455 (1977).
- 10) Tashiro, T. : Antitumor activity and mechanism of the platinum complexes, *Jap. J. Chem. Soc.* **4**, 684 (1988).
- 11) Connors, T. A., Jones, M. and Ross, W. C. J. : New

- platinum complexes with antitumor activity. *Chem. Biol. Interact.* **5**, 415 (1972).
- 12) Kidani, Y. : Development of antitumor platinum complexes. *Yakugaku Zasshi* **105**, 909 (1985).
 - 13) Jung, J. C., Chung, J. H., Chang, S. G. and Rho, Y. S. : *In vitro* antitumor activity and nephrotoxicity of the novel platinum(II) coordination complex containing cis-DACH/diphosphine. *Korean J. Pharmacol.* **32**, 93 (1996).
 - 14) Chang, S. G., Kwon, D. U., Kim, J. I., Jung, J. C., Rho, Y. S. and Hoffman, R. M. : New platinum complex compounds with reduced nephrotoxicity discovered in long-term histocultured of human renal cortical tissues. *Anticancer Research* **15**, 675 (1995).
 - 15) Cook, W. F. and Pickering, G. W. : A rapid method for separating glomeruli from rabbit kidney. *Nature* **182**, 1103 (1958).
 - 16) Jung, J. C., Lee, S. M., Kadakia, N. and Taub, M. : Growth and function of primary rabbit kidney proximal tubule cells in glucose-free serum-free medium. *J. Cellular Physiol.* **150**, 243 (1992).
 - 17) Mossman, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1973).
 - 18) Chang, S. G., Toth K., Black, J. D., Slocum, H. K., Perrapato, S. D., Huben, R. P. and Rustum, Y. M. : Growth of human renal cortical tissues on collagen gel. *In vitro Cell Dev. Biol.* **28** A:128 (1992).
 - 19) Chang, S. G., Slocum, H. K., Toth, K. and Hoffman, R. M. : Glucose consumption end-point in primary histoculture indicates recovery of human tumors from drug treatment. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28** A, 585 (1992).
 - 20) Chang, S. G., Lee, J. H., Hong, D. H., Lee, H. L., Chai, S. E. and Hoffman, R. M. : Comparison of glucose-consumption and thymidine-incorporation endpoints in histocultured human superficial bladder tumors. *Anticancer Res.* **14**, 77 (1994).
 - 21) Pascoe, J. M. and Roberts, J. J. : Interactions between mammalian cell DNA interstrand crosslinking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1345 (1974).
 - 22) Alden, M. W. and Repta, A. J. : Exacerbation of cisplatin-induced nephrotoxicity by methionine. *Chem. Biol. Interact* **48**, 121(1984).
 - 23) Brian, R., Ravi, J., Bhalla, B. and Maldek, J. : Comparison of methods of evaluating nephrotoxicity of cis-platinum. *Clin. Pharmacol. Ther.* **27**, 557 (1980).
 - 24) Gonzales-Vitale, J. C., Hayes, D. M. and Sternberg, S. S. : The renal pathology in clinical trials of cis-platinum. *Cancer* **39**, 1362 (1977).
 - 25) Jones, B. R., Bhalla R. B. and Mladek, J. : Comparison of methods of evaluating nephrotoxicity of cis-platinum. *Clin. Pharmacol. Ther.* **27**(4), 557 (1980).
 - 26) Bodenner, D. L., Dedon, P. C., Katz, J. C. and Borch, R. F. : Selective protection against cis-diamminedichloro platinum(II) induced toxicity in kidney, gut and bone marrow by diethyl-dithiocarbamate. *Cancer Res.* **46**(6), 2751 (1986).
 - 27) Ettinger, L. T. Gaynon, P. S. and Krailo, M. D. : A phase II study of carboplatin in children with recurrent or progressive solid tumors. A report from the childrens group. *Cancer* **73**, 1297 (1994).
 - 28) Freeman, A. E. and Hoffman, R. M. : *In vivo*-like growth of human tumors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2684 (1986).
 - 29) Chung, S. D. Alavi, N., Livingston, D. Hiller, S. and Taub, M. : Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J. Cell Biol.* **95**, 118 (1982).
 - 30) Mortine, T. J. and Borch, R. F. : Quiescent LLC-PK₁ cells as a model for cis-diaminedichloro platinum(II) nephrotoxicity and modulation by thio rescue agents. *Cancer Res.* **48**, 6017 (1988).