

# Methylcholanthrene 유도 섬유육종세포주에서 Doxorubicin 농도에 따른 세포독성과 자멸사의 변화

정진용\* · 왕영필\*\* · 나석주\*\*

=Abstract=

## Cytotoxicity and Apoptosis of Various Concentrations of Doxorubicin in Methylcholanthrene-induced Rat Fibrosarcoma(MCA) Cells

Jin-Yong Jeong, M.D.\*, Young-Pil Wang, M.D.\*\*, Suk-Joo Rha, M.D.\*\*

**Background:** Although pulmonary resection is the standard approach for the management of pulmonary metastases from soft tissue sarcoma, most of them are unresectable and chemotherapy remains the only option. The effectiveness of the cytotoxic drugs may be limited by the toxicities that occur before the therapeutic dose is reached. The regional administration of doxorubicin using pulmonary arterial perfusion in a rodent model can produce 10 to 25 times higher concentrations in the lung than systemic administration with minimal systemic toxicities. However, it is unclear whether a high concentration of doxorubicin has beneficial effects for killing cancer cells. **Material and Method:** We studied this to evaluate the dose-dependent cytotoxic and apoptotic effects of doxorubicin on methylcholanthrene-induced rat fibrosarcoma(MCA) cells. This study examined the cytotoxicity and apoptosis-related gene expressions(Fas, FasL, Bax, caspase 1, caspase 2, caspase 8, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS) in MCA cells after 24 hours exposure to various concentrations of doxorubicin such as 1, 5, 10, 50, and 100  $\mu$ M. **Result:** Dose-dependent cytotoxicity was observed after 24 hours exposure to doxorubicin. However, peak apoptosis after 24 hours exposure was observed at 5  $\mu$ M of doxorubicin. Above 5  $\mu$ M, apoptotic activity was decreased with dose-increment. All mRNA levels of apoptosis-related genes after 24 hours exposure were up-regulated above the control level at 1  $\mu$ M of doxorubicin and then decreased by doxorubicin dose-increment except caspase 8, which showed higher levels than the control level at 5  $\mu$ M. Apoptosis-related protein levels were highest at 1  $\mu$ M of doxorubicin and then decreased by doxorubicin dose-increment. However, Bax and Bcl-xL proteins steadily showed higher levels than the control throughout the different concentrations of doxorubicin. **Conclusion:** These results suggest that apoptosis is the main cytotoxic mechanism in low concentrations of doxorubicin in MCA cells and apoptosis-related genes, such as Bax, caspase 8, and Bcl-xL, are involved. At high concentrations, doxorubicin still

---

\*대전선병원 흉부외과

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Sun General Hospital, Taejon

\*\*가톨릭대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Catholic University Medical College

논문접수일 : 2001년 5월 23일 심사통과일 : 2001년 6월 23일

책임저자 : 나석주(480-130) 경기도 의정부시 금오동 65-1, 의정부성모병원 흉부외과. (Tel) 031-820-3000, (Fax) 031-847-8077

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

can kill MCA cells, even when apoptosis is inhibited, and have its propriety for achieving much cytotoxicity against MCA cells.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2001;34:447-53)

**Key words:** 1. Doxorubicin  
2. Cytotoxicity  
3. Apoptosis  
4. Fibrosarcoma

## 서 론

연부조직 육종의 폐전이(肺轉移)는 매우 빈번하게 발생하며<sup>1)</sup>, 폐절제술이 이에 대한 표준치료법으로 알려져 있다<sup>2,3)</sup>. 하지만 대부분의 폐전이 육종은 폐절제술을 할 수 없는 상태로서 항암제 투여만이 선택할 수 있는 유일한 치료법이 되는데, 항암제 투여는 치료용량에 도달하기전에 발생하는 전신독성으로 인하여 그 효과가 그다지 만족스럽지 못하다<sup>4~7)</sup>. Doxorubicin은 여러 종류의 악성종양에 강력하게 작용하는 항암물질이다. 특히, 연부조직 육종의 치료에서는 없어서는 안될 중요한 항암제로서 그 효과에 대해 이미 보고된 바 있다<sup>8,9)</sup>. Doxorubicin의 주요 작용기전은 1) DNA로의 삽입(intercalation), 2) 유리기 (free radical)의 생성, 3) DNA topoisomerase II 작용의 억제, 4) 자멸사 (apoptosis)의 유발 등으로 알려져 있다<sup>10~13)</sup>. Doxorubicin의 임상 사용 제한의 주요 원인은 심장독성과 골수의 조혈기능 억제이며, 특히 심장독성은 약제의 용량에 따른 심근세포독성의 결과로 발생한다. 이와 같은 doxorubicin의 전신적인 독성을 극복하기 위하여 doxorubicin을 부분적으로 투여하는 방법이 동물실험과 임상 실험에서 연구되고 있다. 특히 폐동맥 관류를 이용한 doxorubicin의 부분투여는 전신독성을 최소화하고, 전신투여시에 비하여 폐에서 10~25배 높은 doxorubicin 농도를 얻을 수 있어 폐에 전이된 육종 치료에 새로운 방법으로 제시되고 있다<sup>14)</sup>, 그러나 고농도의 doxorubicin은 자멸사를 오히려 감소시킨다는 보고가 있어 그 효과에 대해서는 논란이 있다<sup>13,15)</sup>.

본 연구는 methylcholanthrene 유도 섬유육종세포주 (methylcholanthrene-induced rat fibrosarcoma cell line, MCA 세포)에서 doxorubicin 농도에 따른 세포독성과 자멸사의 변화를 보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주의 배양

본 실험에 사용한 세포주는 MCA 세포로서 C57BL/Ka X

C3H/He 1세대 교배종에 methylcholanthrene을 투여하여 유도된 육종세포주의 하나인 1153Ln이며 폐전이를 매우 잘 일으키는 섬유육종세포이다. 이 MCA 세포를 10%(v/v) fetal bovine serum, 0.5 mM L-glutamine, 1% 항생제 (Penstrep, Gibco, USA)가 함유된 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>하에 37°C에서 배양하였다.

### 2. doxorubicin 처리

배양 12 시간째 지수적 증식을 보이고 있는 MCA 세포를 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M농도의 doxorubicin(Sigma, USA)에 각각 24시간 노출하였다. Doxorubicin이 함유되지 않은 phosphate buffered saline(PBS)로 처리한 MCA 세포를 대조군으로 사용하였다.

### 3. 세포독성의 측정

Doxorubicin의 세포독성은 colorimetric assay를 이용한 Cell Proliferation Kit II(XTT) (Boehringer Mannheim, Germany)로 측정하였다. 즉,  $1 \times 10^4$ 개의 MCA 세포를 flat-bottomed 96-wells culture plate에 밤새(12시간) 배양하여 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M의 doxorubicin에 24시간 노출하였다. 배양후 100  $\mu$ l의 fresh media를 바꿔 50  $\mu$ l의 XTT labeling mixture (Boehringer Mannheim, Germany)를 첨가하였다. XTT용액으로 2시간 배양한 후 microtiter plate reader(Dynex Technology, USA)를 사용하여 각 표본의 spectrophotometrical absorbance를 측정하였다. 각 농도의 doxorubicin 처리군을 대조군과 비교하여 생존세포 백분율을 계산하였다.

### 4. 자멸사의 측정

Biocoat Cultureslide(Becton Dickinson, USA)에서  $1 \times 10^6$ 개의 MCA 세포를 포함시켜 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M의 doxorubicin에 24시간 노출시켰다. 24시간 배양후 자멸사 세포를 in situ cell death detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하여 측정하였다. 즉, 4% paraformaldehyde에 고정한 후 endogenous peroxidase를 차단하기 위하여 세포에 methanol에 희석한 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 실온에서 30분간 처리하고, TdT-

mediated X-dUTP nick end labeling(TUNEL) reaction mixture에 37°C에서 1시간 부착시켰다. signal conversion은 converter-horseradish peroxidase(Boehringer Mannheim, Germany)와 DAB substrate solution(Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하였다. 2% methyl green으로 대조염색한 후 TUNEL 양성결과 TUNEL 음성세포의 백분율을 계산하였다.

### 5. mRNA 발현 분석

직경 10 cm의 culture dish에  $5 \times 10^6$ 개의 MCA 세포를 배양하여 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M의 doxorubicin에 24시간 노출시킨 후 TriPure isolation reagent(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 총RNA를 검출하였다. 총RNA의 20 ng을 multi-probe RNase protection assay(RPA)를 위해 사용하였는데, in vitro transcription kit(Pharmingen, USA)과 rAPO-1 multi-probe template set(Pharmingen, USA)을 사용하여 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] (Amersham Pharmacia Biotech, USA) tagged rat mRNA probe를 합성하였고 RPA kit(Pharmingen, USA)을 사용하여 RNase protected probe를 검출된 mRNA에 교잡시켰다. RNase로 처리한 후 각 protected mRNA를 50 watts constant power에서 19 : 1 acrylamide/bisacrylamide gel electrophoresis로 3시간 동안 분리하였다. -80°C에서 film에 dried gel을 밤새 노출한 후 ImageQuant 5.0 software(Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 각 band에 대한 densitometric 분석을 시행하였다. 각 value는 GAPDH scanning density에서의 차이로 표준화시켰다.

### 6. Western Blotting

직경 10 cm culture dish에  $5 \times 10^6$ 개의 MCA 세포를 배양하여 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M의 doxorubicin에 24시간 노출하였다. Doxorubicin 처리 후 총단백질을 추출하여 SDS-polyacrylamide gel에 의해 분리하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 부착시켰다. Blotting후 membrane은 4°C에서 0.2% Tween 20이 포함된 PBS에서 5% non-fat dry milk에 밤새 배양하였다. 각 membrane을 1 : 200으로 희석한 anti-Bax, anti-Fas, anti-caspase 8, anti-Bcl-xL 항체 (Santa Cruz Biotechnology, USA)에 상온에서 1시간동안 배양하였다. PBS에서 10분씩 3차례 세척한 후 membrane은 상온에서 1시간동안 1 : 2000으로 희석한 horseradish peroxidase labeled rabbit or goat antibody(Santa Cruz Biotechnology, USA)로 처리하였다. 각 band는 PBS에서 15분씩 3차례 세척한 후 ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 감지하였다.

### 6. 통계처리

측정치는 평균  $\pm$  표준오차(means  $\pm$  SEM)로 나타내었고, SPSS 9.0 for Windows 통계프로그램을 이용하여 통계처리하

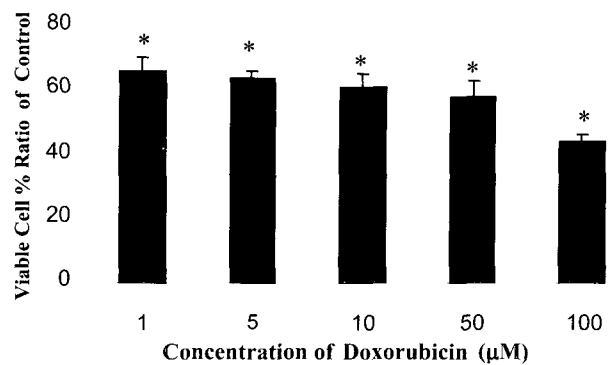


Fig. 1. Viability of MCA cells after 24 hours exposure to doxorubicin. One  $\times 10^4$  MCA cells were incubated with doxorubicin(1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M) and XTT assay was performed. The viable cell percent ratio was calculated by comparing the control with each value. Data are means  $\pm$  SEM(N = 5).

(\*) P<0.05 vs. the control.

였다. 각 용량에 따른 측정치는 Student's t-test로 분석하였으며 통계학적 유의수준은 P<0.05로 하였다.

## 결 과

### 1. Doxorubicin의 농도에 따른 세포독성

MCA 세포에서 doxorubicin 용량에 따른 세포독성을 관찰하기 위하여 96 wells culture plate에  $1 \times 10^4$ 개의 세포를 포함시켜 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M의 doxorubicin을 첨가하여 24시간 노출한 후 spectrophotometrical absorbance를 측정하였다. doxorubicin은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 MCA 세포에서 용량에 비례한 세포독성을 보였다. 세포독성은 1~10  $\mu$ M(34~36%)에서는 비슷하였고, 100  $\mu$ M(53%)에서 가장 높은 독성을 보였으며, 모든 doxorubicin용량에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.05).

### 2. Doxorubicin의 농도에 따른 자멸사

세포독성이 자멸사에 의한 것인지를 관찰하기 위하여 1~100  $\mu$ M의 doxorubicin에 24시간 노출시킨  $1 \times 10^6$  개의 MCA 세포에 TUNEL염색을 하였다. 현미경 시야에서 TUNEL 양성 세포와 TUNEL 음성세포의 수를 계측하여(Fig. 2A) TUNEL 양성 및 음성세포의 비를 계산하였다(Fig. 2B). Fig. 2B에서 보는 바와 같이 1  $\mu$ M의 doxorubicin에서 대조군(6%)에 비하여 자멸사한 세포수가 증가하였으며(12%), 5  $\mu$ M의 doxorubicin에서 가장 증가된 자멸사를 보였다(31%). 하지만 doxorubicin의 용량이 증가함에 따라서 자멸사에 대한 작용은 점차 감소하였으며, 모든 doxorubicin용량에서 대조군에 비하여 통계적으로

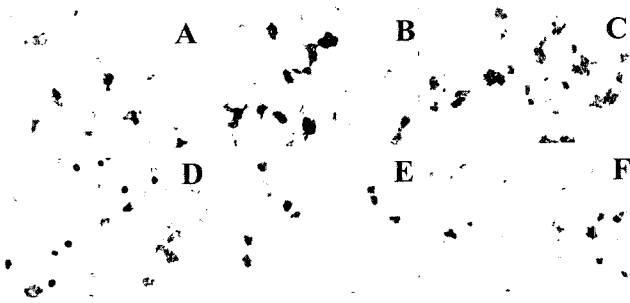


Fig. 2A. In situ cell death detection (TUNEL) after 24 hours doxorubicin exposure.  $1 \times 10^6$  MCA cells were incubated with doxorubicin (A: control, B: 1, C: 5, D: 10, E: 50, F: 100  $\mu$ M) for 24 hours. TUNEL reaction was performed. The slides were counterstained with 2% methyl-green and observed under a light microscope (X 400).

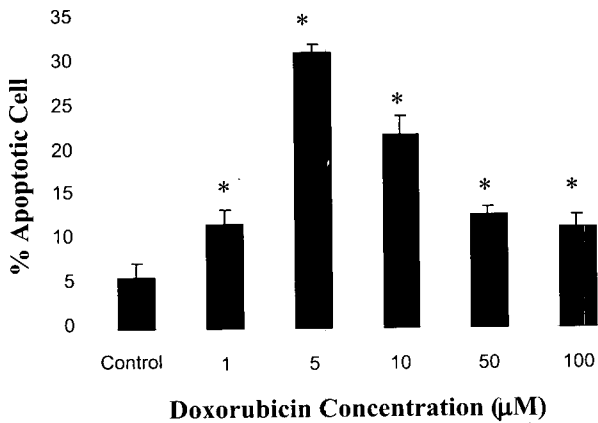


Fig. 2B. Apoptosis after 24 hours doxorubicin exposure in MCA cells.  $1 \times 10^6$  MCA cells were cultured with doxorubicin (control, 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M) for 24 hours. The percent of apoptotic cells was calculated by TUNEL(+)/(-) ratio in high power microscopic field. Data are means $\pm$ SEM(N=5). (\*) P<0.05 vs. the control.

유의한 차이가 있었다(P<0.05).

### 3. 자멸사와 연관된 mRNA 발현

Doxorubicin이 자멸사 유전자의 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 MCA 세포를 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M의 doxorubicin에 24시간 노출시킨 후 Fas, FasL, Bax, caspase 1, 2, 8, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS에 대한 mRNA의 변화를 검사하였다. 모든 mRNA 발현은 1  $\mu$ M의 doxorubicin에서 대조군에 비하여 증가하였으나, 5  $\mu$ M의 doxorubicin에서는 caspase 8을 제외하고 모두가 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 3A). 그보다 높은 농도의 doxorubicin에서 caspase 8, Bax, Bcl-xL, Fas의 mRNA는 대조군에 비하여 낮은 수준이기는 하나 꾸준한 발현을

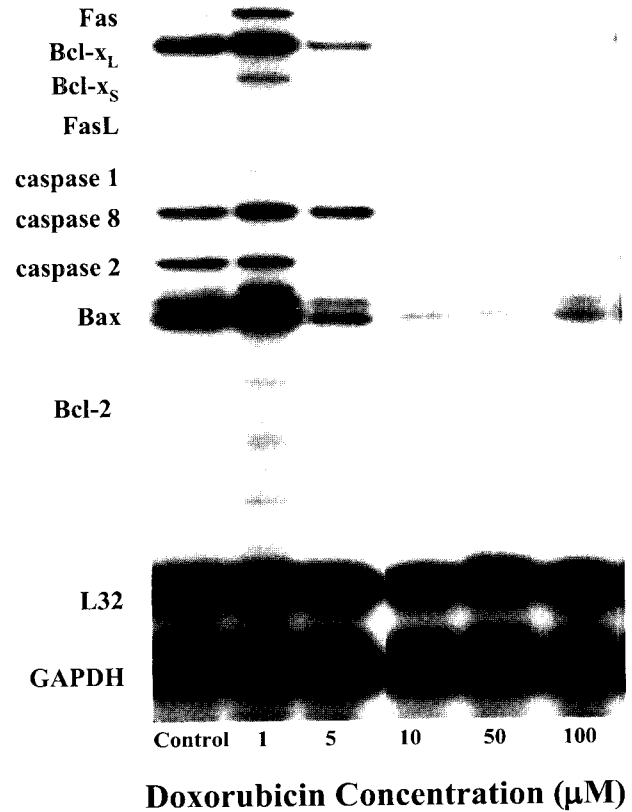


Fig. 3A. mRNA expression of MCA Cells after 24 hours exposure to doxorubicin.  $5 \times 10^6$  MCA cells were incubated with doxorubicin (control, 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M). The total RNA extraction and RNase protection assay were performed.

보였다(Fig. 3A & B). 하지만 FasL, caspase 1, 2, Bcl-2, Bcl-xS의 mRNA는 5  $\mu$ M이상의 doxorubicin에서 대조군 이하로 급격히 감소하여 매우 미약한 발현을 보였다.

### 4. 자멸사와 연관된 단백질에 대한 Western blot 분석

mRNA의 변화가 이와 연관된 단백질과의 상관관계가 있는지 보기 위하여 MCA 세포를 1, 5, 10, 50 및 100  $\mu$ M의 doxorubicin에 24시간 노출한 후 Bax, Fas, caspase 8, Bcl-xL 단백질을 검사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 모든 단백질은 1  $\mu$ M의 doxorubicin에서 증가되어 각각의 mRNA의 변화를 반영하였다. 5  $\mu$ M 이상의 doxorubicin에서는 모든 단백질이 doxorubicin의 용량이 증가함에 따라서 감소하였으나, Bax와 Bcl-xL 단백질은 꾸준한 감소를 보이지 않고 대조군과 같거나 높은 수준을 보였다. 또한, caspase 8 단백질은 이의 mRNA가 증가된 것과는 달리 의미있는 감소를 나타냈다(Fig. 3B & 4).

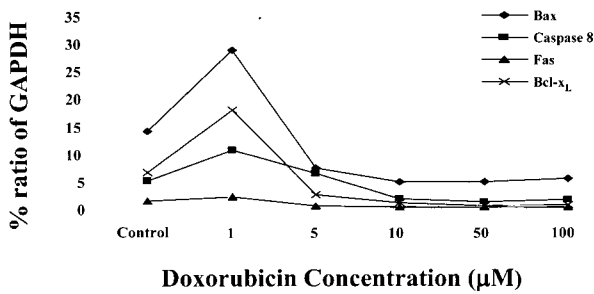


Fig. 3B. Apoptosis-related mRNA expressions after 24 hours doxorubicin exposure in MCA cells. The densitometric analysis of each band was done. Each value of mRNA levels was normalized by GAPDH expression levels.

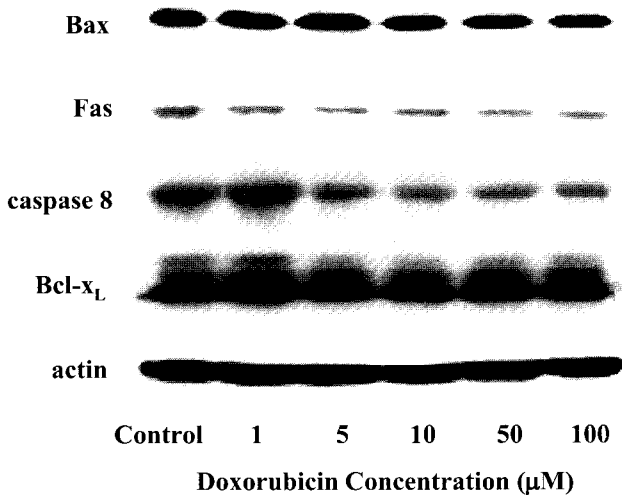


Fig. 4. Protein expressions after 24 hours exposure of doxorubicin in MCA cells.  $5 \times 10^6$  MCA cells were cultured with doxorubicin (control, 1, 5, 10, 50, 100 μM) for 24 hours. Bax, Fas, caspase 8, Bcl-xL, and actin proteins were determined by western blotting.

## 고찰

연부조직 육종은 폐조직으로의 전이가 매우 빈번하게 일어난다<sup>1)</sup>. 따라서 폐로 전이된 육종은 연부조직 육종 환자의 생존율에 큰 영향을 미치게 된다. 폐절제술은 폐전이 육종에 대한 표준치료법으로 알려져 있는데<sup>2,3)</sup>, 폐로 전이된 육종의 외과적 치료 실패는 원발성 종양의 절제시 또는 절제전에 발생하는 미세전이에 기인한다<sup>16)</sup>. 또한, 대부분의 폐전이 육종은 폐절제술을 할 수 없는 상태로써 이런 경우 항암제 투여만이 선택할 수 있는 유일한 치료법이다. 하지만 항암제 투여는 치료용량에 도달하기전에 발생하는 전신독성으로 인하여 그 효과가 그다지 만족스럽지 못하다<sup>4-7)</sup>. Weksler 등<sup>14)</sup>

은 MCA 세포의 폐전이 쥐모델에서 doxorubicin의 선택적 폐동맥관류를 통한 투여를 고안하였고, 이러한 방법은 전신독성을 최소화하면서 전신투여시에 비하여 폐에서 10~25배 높은 doxorubicin 농도를 얻을 수 있어 폐전이 종양을 절제할 때 절제되지 않고 남아있는 폐의 폐동맥을 통하여 doxorubicin을 투여하면 미세전이를 완전히 근절할 수 있다고 제안하였다. 하지만 이러한 고농도의 doxorubicin이 in vitro 실험에서 오히려 자멸사를 억제한다고 알려져 있어 논란의 여지가 있다<sup>13,15)</sup>.

Doxorubicin은 자멸사를 유도하는 효과적인 약제로 알려져 있다<sup>17)</sup>. Tewey 등<sup>15)</sup>은 doxorubicin이 DNA와 분리할 수 있는 조합체를 형성하여 DNA topoisomerase II를 억제한다고 보고하였고, 이 효소의 억제는 새로운 RNA와 단백질 생성에 장애를 유발하고 자멸사를 유발한다고 하였다. 그러나 이러한 과정은 저농도의 doxorubicin(1-10 μM)에서 발생하는 것으로 보인다. 그 이상의 농도에서는 DNA topoisomerase의 억제효과와 자멸사의 유발이 억제된다<sup>13,15)</sup>. Doroshow<sup>18)</sup>는 DNA topoisomerase의 억제만으로도 매우 치명적이지만 암세포를 사멸하는 데는 충분하지 않다고 하였다. Doxorubicin의 세포독성은 DNA topoisomerase 작용을 억제하여 일어날 수 있는 자멸사보다 더 강한데 이는 고농도의 doxorubicin이 자멸사가 아닌 다른 기전에 의하여 세포독성이 있음을 암시한다.

Ling 등<sup>13)</sup>은 쥐의 백혈병 세포에서 1 μM의 doxorubicin이 자멸사를 유도하지만 10 μM의 doxorubicin은 자멸사를 억제한다고 보고하였다. 이들은 1 μM의 doxorubicin에서만 자멸사에 필요한 어떤 요소가 작용하지만 고농도의 doxorubicin에서는 다른 기전이 발생할 것이라고 추측하였다. Müller 등<sup>19)</sup>은 림프구 백혈병 세포에서 비록 1-100 μM의 doxorubicin이 비슷한 세포독성을 보이지만, 3 μM까지의 doxorubicin은 자멸사의 유도에 의해서 작용하고 고농도의 doxorubicin은 자멸사가 억제된다고 하고, 1 μM의 doxorubicin은 자멸사 유전자의 발현을 유발하여 자멸사를 유도할 것이지만, 그 농도 이상의 doxorubicin은 자멸사 유도에 필요한 단백질의 de novo 유전자 발현을 억제한다는 가설을 제안하였다. 본 실험에서 자멸사와 연관된 mRNA 발현은 1 μM의 doxorubicin에서 나타났다. 그러나 5 μM의 doxorubicin에서 자멸사와 연관된 mRNA와 단백질 합성 억제가 의미있게 시작되었지만, 최고의 자멸사의 효과는 5 μM의 doxorubicin에서 관찰되었다. 이러한 감소된 mRNA와 단백질은 5 μM의 doxorubicin에서의 자멸사 효과를 억제하지 못하였다. 또한 5 μM보다 높은 농도의 doxorubicin에서 자멸사는 억제되지만 세포독성은 오히려 더욱 증가되었다. 이러한 doxorubicin의 mRNA 합성의 억제와 세포독성 사이의 불일치는 다른 저자들도 보고한 바 있다<sup>20)</sup>.

최근 Gewirtz<sup>21,22)</sup>는 doxorubicin의 작용이 DNA의 광범위한 손상보다 특정부위의 손상이 더 중요하다고 하다고 하였다. Capranico 등<sup>23)</sup> 역시 doxorubicin이 DNA의 특정부위에서 topoisomerase와 연관된 DNA 손상을 유발하는 실험을 하여 doxorubicin이 특정한 유전자에 손상을 준다는 근거를 제시하였다. 이에 따라 최근에는 doxorubicin과 자멸사 유전자의 발현에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 실험의 결과도 역시 Fig. 3B와 4에서 보는 바와 같이 5  $\mu$ M의 doxorubicin에서 doxorubicin에 의한 자멸사가 Bax와 caspase 8과 같은 유전자와 관련되어 있음을 보여준다. 특히 doxorubicin은 caspase 8을 활성화하는 Fas/FasL system에 의하여 자멸사가 유발되는 것으로 생각되어왔다<sup>24,25)</sup>. 그러나 본 실험의 결과는 5  $\mu$ M의 doxorubicin에서 Fas와 FasL의 mRNA와 단백질이 대조군보다 낮아서 Fas/FasL과 doxorubicin에 의한 자멸사와의 연관성은 없어 보인다. 하지만 5  $\mu$ M의 doxorubicin에서 caspase 8 mRNA의 수치가 대조군보다 높은 것으로 보아 caspase 8의 발현은 Fas/FasL system보다는 TNF-R system과 같은 다른 요소에 의하여 활성화 될 수 있음을 보여준다.

Perez 등<sup>26)</sup>은 Bax 유전자가 제거된 쥐의 난모세포에서 doxorubicin에 의한 자멸사가 일어나지 않음을 보고하여 Bax를 doxorubicin의 자멸사 기전으로 제시하였다. 본 실험의 결과에서는 고농도의 doxorubicin에 의한 자멸사는 감소하였으나 Bax와 Bcl-xL 단백질은 doxorubicin에 노출된 후에도 대조군과 같거나 높게 유지되었다. 이러한 결과는 Bcl-xL은 doxorubicin에 의한 자멸사와 밀접한 관계가 있는 Bax와 안정된 복합체를 형성하여 Bax에 의한 자멸사를 억제할 것이라는 보고를 뒷받침하고 있다<sup>27)</sup>.

비록 자멸사가 약리학적으로 적절한 농도의 doxorubicin에 의한 세포독성의 주된 기전일지라도 고농도의 doxorubicin에 의한 세포독성의 기전은 여전히 불명확하다. 어떤 연구들은 가능성 있는 기전으로 DNA로의 삽입<sup>10)</sup>과 유리기의 생성<sup>12)</sup>을 보고하고 있다. 본 실험에서는 Doxorubicin은 5  $\mu$ M보다 높은 농도의 doxorubicin에서는 자멸사의 유도가 차단됐음에도 불구하고 세포독성은 doxorubicin의 용량에 따라 증가하였다. 이 결과로 보아 선택적인 폐동맥관류에 의해 얻을 수 있는 고농도의 doxorubicin은 자멸사의 다른 기전에 의하여 종양 세포를 사멸할 수 있으며 폐전이 육종에 대한 치료에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

결론적으로, 저농도(1~5  $\mu$ M) doxorubicin의 세포독성은 자멸사에 의하며, 이러한 과정은 Bax와 caspase 8에 의해 중재되는 것으로 보이고 Bcl-xL은 Bax에 의한 자멸사로부터 세

포를 보호하는 것 같다. 그리고 고농도의 doxorubicin은 자멸사를 억제하지만 doxorubicin의 용량에 따라 세포독성이 증가되어, doxorubicin에 의한 DNA로의 삽입이나 유리기의 생성과 같은 다른 기전들이 고농도 doxorubicin에 의한 암세포독성에 관련될 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Potter DA, Glenn J, Kinsella T. *Patterns of recurrence in patients with high grade soft-tissue sarcomas.* J Clin Oncol 1985;3:353-66.
2. Jablons D, Steinberg SM, Roth J, Pittaluga S, Rosenberg SA, Pass HI. *Metastasectomy for soft tissue sarcoma. Further evidence for efficacy and prognostic indicators.* J Thorac Cardiovasc Surg 1989;97:695-705.
3. Gadd MA, Casper ES, Woodruff JM, McCormack PM, Brennan MF. *Development and treatment of pulmonary metastases in adult patients with extremity soft tissue sarcoma.* Ann Surg 1993;218:705-12.
4. Omura GA, Major FJ, Blessing JA, et al. *A randomized study of adriamycin with and without dimethyl triazenoimidazole carboxamide in advanced uterine sarcomas.* Cancer 1983;52:626-32.
5. Lerner HJ, Amato DA, Savlov ED, et al. *Eastern cooperative oncology group: a comparison of adjuvant doxorubicin and observation for patients with localized soft tissue sarcoma.* J Clin Oncol 1987;5:613-7.
6. Casper ES, Gaynor JJ, Hajdu SI, et al. *A prospective randomized trial of adjuvant chemotherapy with bolus versus continuous infusion of doxorubicin in patients with high grade extremity soft tissue sarcoma and an analysis of prognostic factors.* Cancer 1991;68:1221-9.
7. Lanza LA, Putnam JB Jr, Benjamin RS, Roth JA. *Response to chemotherapy does not predict survival after resection of sarcomatous pulmonary metastases.* Ann Thorac Surg 1991;51:219-24.
8. Carter SK. *Adriamycin-a review.* J Natl Cancer Inst 1975; 55:1265-74.
9. Verweij J, Pinedo HM. *Systemic treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma.* In: Pinedo HM, Verweij J, Suit HD. *Soft Tissue Sarcomas: New Developments in the Multidisciplinary Approach to Treatment.* Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991:75-91.
10. Zunino F, Gambetta R, DiMarco A. *The inhibition in vitro of DNA polymerase and RNA polymerase by daunomycin and adriamycin.* Biochem Pharmacol 1975; 24:309-11.
11. Chuang RY, Chuang LF. *Inhibition of chicken myeloblastosis RNA polymerase II activity by adriamycin.* Biochemistry 1979;18:2069-73.
12. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. *Doxorubicin(adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity.* Pharmacol Ther

- 1990;47:219-31.
13. Ling YH, Priebe W, Perez-Soler R. *Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells.* Cancer Res 1993; 53: 1845-52.
  14. Weksler B, Lenert J, Ng B, Burt M. *Isolated single lung perfusion with doxorubicin is effective in eradicating soft tissue sarcoma lung metastases in rat model.* J Thorac and Cardiovasc Surg 1994;107:50-4.
  15. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. *Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II.* Science 1984;226:466-8.
  16. Huth JF, Holmes EC, Vernon SE, Callery CD, Ramming KP, Morton DL. *Pulmonary resection for metastatic sarcoma.* Am J Surg 1980;140:9-16.
  17. Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblance J, Whitfield JF, Sikorska M. *Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes.* Cancer Res 1991;51:1078-85.
  18. Doroshow JH. *Anthracyclines and anthracenediones.* In: Chabner BA, Longo DL. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:409-34.
  19. Müller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D, Halliwell B. *Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin-apoptosis and oxidative DNA damage.* Biochem Biophys Res Commun 1997;230:254-7.
  20. Siegfried JM, Sartorelli AC, Tritton TR. *Evidence for the lack of relationship between inhibition of nucleic acid synthesis and cytotoxicity of adriamycin.* Cancer Biochem Biophys 1983;6:137-42.
  21. Gewirtz DA. *Does bulk damage to DNA explain the cytostatic and cytotoxic effects of topoisomerase II inhibitor?* Biochem Pharmacol 1991;42:2253-8.
  22. Gewirtz DA. *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin.* Biochem Pharmacol 1999;57:727-41.
  23. Capranico G, Kohn KW, Pommier Y. *Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin.* Nucl Acids Res 1990; 18: 6611-9.
  24. Friesen C, Fulda S, Debatin KM. *Deficient activation of the CD95(APO-1/Fas) system in drug-resistant cells.* Leukemia 1997;11:1833-41.
  25. Mizutani Y, Okada Y, Yoshida O, Fukumoto M, Bonavida B. *Doxorubicin sensitizes human bladder carcinoma cells to Fas-mediated cytotoxicity.* Cancer 1997;79:1180-9.
  26. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. *Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction.* Nature Medicine 1997;3:1228-32.
  27. Decaudin D, Geley S, Hirsch T, et al. *Bcl-2 and Bcl-xL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents.* Cancer Res 1997;57:62-7.

**=국문초록=**

**배경:** 연부조직 육종의 폐전이 치료법은 폐절제술이지만, 대부분의 폐전이육종은 항암제 투여를 필요로 한다. 항암제 투여는 치료용량에 도달하기전에 발생하는 전신독성으로 인하여 그 효과가 만족스럽지 않다. 연부조직 육종의 항암제로 많이 사용하는 doxorubicin을 폐조직에 직접 투여하면 전신투여시에 비하여 전신독성이 적을 뿐만 아니라 폐에서 10~25배 높은 doxorubicin 농도를 얻을 수 있다. 그러나 이와 같은 고농도 doxorubicin의 암세포에 대한 효과에 대해서는 불명확하다. **대상 및 방법:** 본 연구는 methylcholanthrene 유도 섬유육종세포주(methylcholanthrene-induced rat fibrosarcoma cell line, MCA 세포)를 여러 농도의 doxorubicin에 24시간 노출한 후 세포독성과 자멸사(apoptosis) 유전자(Fas, FasL, Bax, caspase 1, caspase 2, caspase 8, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS) 발현을 살펴보았다. **결과:** MCA 세포에 대한 doxorubicin(1-100 μM)의 세포독성은 용량에 따라서 증가하였으나, 자멸사의 최고치는 5 μM의 doxorubicin에서 나타났다. 자멸사와 연관된 유전자의 모든 mRNA는 1 μM에서 대조군에 비해 증가한 후 doxorubicin의 용량이 증가함에 따라 감소하였는데, caspase 8은 5 μM의 doxorubicin에서도 대조군보다 높은 수치를 보였다. 자멸사와 연관된 단백질은 1 μM의 doxorubicin에서 가장 높은 수치를 나타낸 후 doxorubicin의 용량이 증가함에 따라 감소하였으나 Bax와 Bcl-xL 단백질은 모든 용량의 doxorubicin에서 대조군과 같거나 높은 수준을 보였다. **결론:** 결론적으로 저농도(1-5 μM)의 doxorubicin에서 자멸사는 MCA 세포를 사멸시키는 주된 작용기전이고, 이때에 자멸사와 연관된 유전자인 Bax, caspase 8, Bcl-xL이 관여되는 것으로 보이며, 그보다 높은 농도의 doxorubicin에서는 자멸사는 억제되지만 MCA 세포에 대한 강력한 세포독성을 보여, 자멸사 이외의 다른 기전이 기여할 것으로 생각된다.

- 중심 단어:** 1. Doxorubicin  
2. 세포독성  
3. 자멸사  
4. 악성 섬유육종