대 한 골 관 절 종 양 학 회 지
J. of Korean Bone & Joint Tumor Soc.
Volume 7, Number 1, March, 2001

항암제 함유 골시멘트에서 유리되는 아드리아마이신의 세포 독성

아주대학교 의과대학 정형외과학교실

장동욱 · 이동신 · 최선실 · 최승준 · 어수익 · 김병석

목 적 : 아드리아마이신 함유 골시멘트의 국소 항암제 치료로서의 가능성을 알아보고자 실험을 실시하였다.

대상 및 방법 : Palcos R, LVC, CMW 3, Simplex P의 4종류 골시멘트에 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎의 각각 다른 농도로 균일하게 섞은 후, 원주형 또는 납작한 형의 모양에 따른 아드리아마이신 용출 차이, ddH2O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수 등의 주위 환경에 따른 아드리아마이신 용출 차이를 연구하였다. 또한 용출된 아드리아마이신의 세포 독성을 알아보고자, 골육종 세포주 Saos-2를 골시멘트 단독, 각기 다른 3종류의 아드리아마이신 농도를 함유한 골시멘트와 같이 37 C, 5% CO_2 조건하에서 가습 배양기내에서 배양을 실시하여, MTT assay 방법으로 세포 생존율을 확인하였다.

결 과 : 납작한 모양이 원주형보다 아드리아마이신 용출이 많았고, 3%, 0.9%, 0.45%의 식염수 순으로 아드리아마이신 용출이 줄어 들었으며, CMW 3, Simplex P가 Palacos R, LVC보다 아드리아마이신 용출이 많았으며, 아드리아마이신 농도가 2.5㎎, 5㎎, 25㎎ 순으로 세포 독성은 각각 95%, 98%, 99%이었다.

결 론 : 적절한 용량의 아드리아마이신을 골시멘트에 섞는다면, 용출된 아드리아마이신이 세포 독성을 가져 국소 항암제 치료 수단으로 이용 가능성을 확인하였다.

색인 단어 : 골시멘트, 아드리아마이신, 국소 항암 치료

서 론

만성 골수염 치료에서 적절한 부골 절제술 후 항생제 함유 골시멘트 삽입시 골시멘트 주변으로 항생제를 지속적으로 방출한다고 알려져 있으며[1], 이런 약물 전달 체계(drug delivery system)는 그 정확한 기전은 모르나, 암환자에서 골시멘트에 적절한 항암제의 혼합체가 골시멘트와 항생제 혼합체와 유사한 약물 전달 체계를 유지한다면 좋은 국소 항암 치료법의 하나라고 사료되었다.

골시멘트와 항암제인 메토트렉세이트(methotrexate)의 혼합체는 단기간일지라도 지속적으로 골시멘트에서 메토트렉세이트를 방출한다는 보고[4,8,11,15,16]가 있으며, 고농도 메토트렉세이트는 골유합에 지장을 준다는 보고가 있어 정형외과 영역에서의 사용 제한

※통신저자 : 김 병 석
아주대학교 의과대학 정형외과학교실
경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지
Tel : 031) 219-5224, Fax : 031) 219-5229, E-mail : bskim@madang.ajou.ac.kr

이 예견되었으나, 아드리아마이신(adriamycin: doxorubicin)에 대한 연구는 거의 없는 실정이다[15]. 아드리아마이신에 대한 연구가 시도되어 전신 항암제 투여로 인한 부작용은 최소화하고, 항암제의 병소의 국소 항암제 농도를 높여주어, 치료 효과는 극대화할 수 있는 항암제 국소 치료 방법이 개발되면, 암환자의 치료에 많은 도움이 되리라 사료된다. 외국에서는 극히 일부에서 여기에 대한 연구가 시작되었으나, 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 없어 항암제 함유 골시멘트에서의 항암제 용출에 대한 연구가 시급한 실정이다.

연구의 첫단계로 아드리아마이신 함유 골시멘트 모델을 만들어 항암제 아드리아마이신이 주변 환경 변화에 대해 아드리아마이신 용출에 어떤 영향을 주는지, 단위 시간당 용출된 아드리아마이신의 양, 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출의 차이, 방출된 아드리아마이신의 골육종 세포주 Saos-2의 세포 독성 등에 관한 실험실(***in vitro***) 연구를 실시하여, 항암제 함유 골시멘트가 새로운 약물 전달 체계의 하나일 가능성을 확인하여, 골육종 및 수많은 전이성 골암 등의 새로운 치료법 개발에 기여하고자 본 연구를 시작하였다.

연구 대상 및 방법

1. 대상

실험에 사용된 골시멘트는 Palacos R(***Schering-Plough***), LVC(low viscosity cement; ***Zimmer***), CMW 3(***DePuy***), Simpex P(***Howmedica***) 등의 4종류로 모두 항생제가 함유되지 않은 골시멘트를 선택하였다. 골시멘트의 구성 성분은 Palacos R 40g은 methyl methacrylate/methyl acrylate copolymer 38.8g, benzoyl peroxide 0.2g, zirconium dioxide 6.0g, chlorophyll 0.001g, LVC는 40g 중 methyl methacrylate monomer 97.25%, N,N-dimethyl-p-toluidine 2.75%, hydroquinone 75ppm, CMW 3는 40g 중 polymethyl methacrylate 88%, benzoyl peroxide 2%, barium sulphate 10%, Simpex P는 40g 중 methyl methacrylate-styrene-copolymer 75%, polymethyl metahcrylate 15%, barium sulphate 10% 등으로 구성되어 있으며, 거의 다 polymethylmethacrylate, barium sulphate 또는 zirconium dioxide, polymerization inhibitor로 구성된 분말과 methylmethacrylate monomer 및 activator로 구성된 액체로 조성되어 있다.

사용된 항암제는 독시루비신 하이드로클로라이드(Doxirubicin hydrochloride; ***Pharmacia Upjohn***)로 병당 50㎎(vial) 분말을 사용하였으며, 골시멘트 그람 당 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎의 농도로 분말을 섞은 후 용매를 이용하여 골시멘트 펠릿(pellets)을 만들었다.

2. 방법

연구 방법으로 아드리아마이신 함유 골시멘트 펠릿을 제작하여, 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 차이, 골시멘트의 주위 환경에 따른 아드리아마이신 용출 차이, 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출 차이, 아드리아마이신 농도에 따른 골시멘트의 아드리아마이신 용출 차이, 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포 독성 정도 등을 검증하기 위하여 실험 모델을 설정하였다.

1) 아드리아마이신 함유 골시멘트 펠릿 제작

실험에 사용되는 골시멘트 펠릿의 크기는 일정한 크기를 유지하고 실험의 정확도를 기하기 위하여 주형(mold)을 사용[15]하였는데, 여기에서 사용되는 주형으로는 세포 배양에 사용되는 배양 면적(culture area) 0.33㎠×1㎝인 96 MicroWell Plates(***flat bottom, Nunc #167008***)를 이용하여 0.33㎠×1㎝ 크기의 원주형(cyclindrical shape)의 골시멘트 펠릿을 만들었고, 사용된 골시멘트는 Palacos R, LVC, CMW 3, Simplex P를 각각 용도에 맞게 이용하였다. 사용된 항암제는 아드리아마이신 분말을 이용하였고 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎ 및 대조군으로 항암제가 섞이지 않은 골시멘트만의 펠릿을 실온에서 methyl methacrylate monomer를 섞어 골시멘트가 굳기전에 96 MicroWell Plate의 각각의 well에 일정량을 넣어 약 10분간 굳힌다. 이때 얻어진 골시멘트 펠릿은 농도별로 구분하여 각각의 펠릿의 무게를 측정한 후 무균 상태로 각각 세포 배양용 프라스크에 넣어 실험에 사용될 때까지 4。C 냉장고에 보관하였다.

골시멘트 펠릿에서 용출되는 항암제 농도를 측정

하기 위하여 사용된 용매로는 ddH2O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수(중외제약)를 사용하였으며, 이때 사용된 세포 배양용 dish로는 100㎜ culture dishes(culture area: 145㎠, Nunc #168381; ***Corning***)를 사용하였다.

2) 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 차이

Palacos R 시멘트를 실험에 이용하였고, 시멘트 1g 당 2.5㎎의 아드리아마이신 농도로 골시멘트를 제작하였으며, 골시멘트 펠릿은 원주형 모양(cylinder shape) 3개, 1㎜ 두께의 납작한 모양(flat shape) 3개를 각각 만들어, 세포 배양용 dish에 0.9% 생리적 식염수 10㎖를 첨가한 후, 원주형 모양 및 납작한 모양의 골시멘트 펠릿 1개씩 3개의 서로 다른 dish에 각각 넣어 1시간 간격으로 24시간 동안 1㎖의 아드리아마이신이 용출된 식염수를 채취하여 microtube에 보관하였고 1㎖의 식염수를 다시 보충하는 방식으로 실험을 계속하였다. 다시 실험 2일째부터는 매일 2주일 동안 1㎖의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하여 spectrophotometry (Beckman)로 optic density를 구할때까지 -20 C 냉동고에 보관하였다. 아드리아마이신 농도를 측정하기 위하여 사용된 wave length는 490nm이었다.

3) 골시멘트 주위 환경에 따른 아드리아마이신 용출 차이

각각 3개씩의 세포 배양용 dish에 ddH2O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수를 각각 10㎖ 씩 pipet한 후, 각 dish에 Palcos R 골시멘트 1g에 2.5㎎의 아드리아마이신을 넣어 만든 원주형 모양의 골시멘트 펠릿을 각각 1개씩 넣고 이를 다시 3조(sets)로 만든 후, 1시간 간격으로 1㎖의 아드리아마이신이 용출된 식염수를 채취하여 microtube에 보관하는 등의 방법 2를 반복 실시하였다.

4) 골시멘트의 종류에 따른 아드리아마이신 용출 차이

Palacos R, LVC, CMW 3, Simplex P의 4종류의 골시멘트를 각각 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5㎎을 실온에서 적절하게 섞은 후 methyl methacrylate monomer를 혼합하여 만든 골시멘트 펠릿을 세포 배양용 dish에 각각 1개씩 넣은 후 0.9% 식염수 10㎖를 각각 넣어 이를 다시 3조로 만들어, 1시간 간격으로 1㎖의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하는 등의 방법 2를 반복 실시하였다.

5) 아드리아마이신 농도에 따른 골시멘트의 아드리아마이신 용출 차이

LVC를 이용하여 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎을 각각 섞은 후 methyl methacrylate monomer를 적절하게 혼합하여 골시멘트 펠릿을 만든 후, 세포 배양용 dish에 각각 1개씩 넣은후 0.9% 생리적 식염수 10㎖를 넣어 이를 다시 3조로 만들어, 1시간 간격으로 1㎖의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하는 등의 방법 2를 반복 실시하였다.

6) 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포 독성 차이

골육종 세포주 Saos-2를 미국의 세포주 은행(ATCC)에서 분주받아, McCoy 5a 배지에서 37 C, 5% CO_2의 조건하에서 가습 세포 배양기(humidified incubator)에서 골육종 세포주 Saos-2를 배양하여, 각 dish당 세포수가 7.5×10^5 세포가 되게 배양한 다음, 골육종 세포주 Saos-2만 단독 배양, 골육종 세포주 Saos-2에 LVC(골시멘트만 있는 대조군)만 넣어 배양, 골육종 세포주 Saos-2에 시멘트 1g 당 2.5㎎, 5㎎, 25㎎의 아드리아마이신이 각기 함유된 골시멘트 펠릿을 1개씩 넣어 배양하고, 이런 모델을 3조씩 만들어 48시간 배양하여 세포 독성 검사를 실시하였다. 이때 세포의 생존율을 확인하기 위하여 MTT dye를 5㎎/㎖를 첨가하여 4시간 동안 배양하여 생존한 골육종 세포주 Saos-2의 mitochondrial reductase에 의해 MTT가 blue formazan crystal로 변한 것을 isopropanol로 용해시켜 550nm의 wave length를 이용하여 ELISA plate reader로 optic density를 확인하였다.

7) 결과 분석 및 통계 처리

위의 각기 다른 실험군에서 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 농도는 시간 경과에 따라 ELISA plate reader 결과인 optic density를 각기 아드리아마이신 농도로 환산하여 분석하였고, SPSS version 7.0의 통계 Package를 사용하여

Table 1. Differences of adriamycin concentrations eluted from 2.5㎎ of adriamycin-impregnated Palacos R bone cement between the flat and cylindrical shape.

Time(hrs)	concentration (10^{-4}㎎/㎖)	
	flat	cylindrical
1	30	20
2	30	30
3	30	30
4	30	20
5	30	20
6	30	20
7	30	30
8	30	30
9	20	20
10	20	10
11	20	6.08
12	20	4.24
13	10	1.87
14	9.97	3.87
15	10	6.08
16	10	10
18	10	6.08
20	10	8.07
22	9.97	2.37
24	8.72	2.69

반복 측정자료 분석법(GLM-Repeated Measure)을 실시하였고, 그 통계학적 의미를 분석하였다.

결 과

1. 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 차이

Palacos R 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5㎎의 농도로 아드리아마이신 함유 골시멘트를 만들어, 납작한 모양(flat shape)과 원주형(cylinder shape)의 두가지 모델을 이용하여 각각 3번씩 실험하여 평균한 결과, 실험 시간대 별로 24시간 동안 용출된 항암제의 농도를 보면 납작한 모양의 경우 30, 30, 30, 30, 30, 30, 30, 30, 30, 20, 20, 20, 20, 10, 9.97, 10, 10, 10, 10, 9.97, 8.72($\times 10^{-4}$ ㎎/㎖)이었고, 원주형 모양은 20, 30, 30, 20, 20, 20, 30, 30, 20, 10, 6.08, 4.24, 1.87, 3.87, 6.08, 10, 6.08, 8.07, 2.37, 2.69($\times 10^{-4}$㎎/㎖)이었다(Table 1).

Table 2. Differences of adriamycin concentrations eluted from 2.5㎎ adriamycin-impregnated Palacos R bone cement under the four different environmental solutions (3%, 0.9%, 0.45% saline & ddH2O, respectively).

Hrs	concentration (10^{-4}㎎/㎖)			
	ddH2O	0.45% NS	0.9% NS	3% NS
1	3.75	20	30	30
2	2.6	20	30	30
3	1.5	20	20	20
4	3.31	20	20	30
5	1.53	20	20	30
6	1.59	20	20	20
7	6.53	20	30	30
8	10	20	30	40
9	N/D	10	20	10
10	N/D	10	10	9.64
11	1.59	10	6.08	20
12	N/D	8.75	4.24	10
13	N/D	8.75	1.87	10
14	N/D	8.75	3.87	10
15	N/D	8.77	6.08	9.33
16	2.64	10	10	20
18	N/D	7.02	6.08	10
20	N/D	7.02	8.07	7.46
22	2.54	4.39	0.24	7.46
24	N/D	7.91	0.03	10

N/D : not detectable

2. 골시멘트의 주변 환경에 따른 아드리아마이신 용출 차이

Palacos R 골시멘트를 이용하여 만든 원주형 모양의 펠릿(골시멘트 1그람 당 아드리아마이신 2.5㎎ 함유)을 ddH2O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수속에서 각각 배양한 결과, ddH2O에서는 3.75, 2.6, 1.5, 3.31, 1.53, 1.59, 6.53, 10, 0, 0, 1.59, 0, 0, 0, 0, 2.64, 0, 0, 2.54, 0($\times 10^{-4}$㎎/㎖)이었고, 0.45% 식염수는 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 10, 10, 10, 8.75, 8.75, 8.75, 8.77, 10, 7.02, 7.02, 4.39, 7.91($\times 10^{-4}$㎎/㎖)이었고, 0.9% 식염수에서는 30, 30, 20, 20, 20, 20, 30, 30, 20, 10, 6.08, 4.24, 1.87, 3.87, 6.08, 10, 6.08, 8.07, 0.24, 0.03($\times 10^{-4}$㎎/㎖)이었고, 3% 식염수에서는 30, 30, 20, 30, 30, 20, 30, 40, 10, 9.64, 20, 10,

Table 3. Differences of adriamycin concentrations eluted from LVC, CMW 3, Simplex P, Palacos R

Hrs	concentration (10^{-4}㎎/㎖)			
	2.5㎎ LVC	2.5㎎ CMW3	2.5㎎ Simplex	2.5㎎ Palacos
1	10	20	20	30
2	7.87	20	20	30
3	9.52	20	20	20
4	9.52	20	20	20
5	8.97	20	20	20
6	10	40	20	20
7	10	20	20	30
8	10	20	3	30
9	10	20	20	20
10	8.97	20	20	10
11	8.97	20	20	6.08
12	8.97	20	20	4.24
13	7.87	20	20	1.87
14	8.42	20	20	3.87
15	7.87	20	20	6.08
16	10	20	20	10
18	8.42	20	20	10
20	8.97	20	20	6.08
22	8.97	20	20	6.08
24	10	20	20	8.07

Table 4. Differences of adriamycin concentrations eluted from 2.5㎎, 5㎎ or 25㎎ adriamycin-impregnated LVC bone cement.

Hrs	concentration (10^{-4}㎎/㎖)		
	2.5㎎ LVC	5㎎ LVC	25㎎ LVC
1	10	20	30
2	7.87	10	20
3	9.52	10	10
4	9.52	10	20
5	8.97	10	20
6	10	10	20
7	10	10	20
8	10	20	20
9	10	10	10
10	8.97	10	20
11	8.97	10	10
12	8.97	10	10
13	7.87	10	10
14	8.42	10	10
15	7.87	10	10
16	10	10	20
18	8.42	10	10
20	8.97	10	10
22	8.97	10	10
24	10	10	10

10, 10, 9.33, 20, 10, 7.46, 7.46, 10(×10^{-4}㎎/㎖)이었다(Table 2).

3. 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출 차이

골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5㎎ 함유한 골세멘트가, 골시멘트 종류별로(Palacos R, LVC, CMW3, Simplex P) 용출된 시간당 아드리아마이신 농도는, Palacos R은 30, 30, 20, 20, 20, 20, 30, 30, 20, 10, 6.08, 4.24, 1.87, 3.87, 6.08, 10, 10, 6.08, 6.08, 8.07(×10^{-4}㎎/㎖)이었고, LVC의 경우 10, 7.87, 9.52, 9.52, 8.97, 10, 10, 10, 10, 8.97, 8.97, 8.97, 7.87, 8.42, 7.87, 10, 8.42, 8.97, 8.97, 10(×10^{-4}㎎/㎖)이었고, CMW 3는 20, 20, 20, 20, 20, 40, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20(×10^{-4}㎎/㎖)이었고, Simplex P는 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 30, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20, 20(×10^{-4}㎎/㎖)이었다(Table 3).

4. 아드리아마이신 농도에 따른 골시멘트의 아드리아마이신 용출 차이

LVC 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎을 섞은 후, 용출되는 시간당 아드리아마이신 농도는, 2.5㎎ 농도에서 10, 7.87, 9.52, 9.52, 8.97, 10, 10, 10, 10, 8.97, 8.97, 8.97, 7.87, 8.42, 7.87, 10, 8.42, 8.97, 8.97, 10(×10^{-4}㎎/㎖)이었고, 5㎎ 농도에서 20, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10(×10^{-4}㎎/㎖)이었고, 25㎎ 농도에서는 30, 20, 10, 20, 20, 20, 20, 20, 10, 20, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 10, 10, 10, 10(×10^{-4}㎎/㎖)이었다(Table 4).

5. 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포 독성 차이

골육종 세포주 Saos-2를 McCoy 5a 배지(37 C, 5% CO_2의 조건하에서 가습 세포 배양기)내에서

Table 5. Cellular viability of Saos-2 at 48 hours after initial culture.

	Cell count	%
Normal condition	238×10^4	100
Bone cement	62×10^4	26
Bone cement with 2.5㎎ ADR	12.5×10^4	5
Bone cement with 5㎎ ADR	5.4×10^4	2
Bone cement with 25㎎ ADR	1.6×10^4	1

ADR : adriamycin
Cell count by MTT assay

7.5×10^5 세포수(Fig. 5A)로 48시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, Saos-2만을 배양한 경우, Saos-2를 LVC 골시멘트만을 넣고 배양한 경우 각각 생존한 세포수는 238×10^4(Fig. 5B), 62×10^4(Fig. 5C)이었고, Saos-2를 LVC 골시멘트 그람당 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎ 함유의 조건으로 각각 배양한 경우 각각 생존한 세포수는 12.5×10^4(Fig. 5D), 5.4×10^4(Fig. 5E), 1.6×10^4(Fig. 5F)이었다. 각각의 세포 독성은 Saos-2만 배양한 결과 생존한 세포수를 100%로 볼 때, LVC 골시멘트만 배양한 경우 74%, LVC 펠릿(아드리아마이신 2.5㎎ 함유)은 95%, LVC 펠릿(아드리아마이신 5㎎ 함유)은 98%, LVC 펠릿(아드리아마이신 25㎎ 함유)은 99%의 세포 독성을 보여주었다(Table 5).

고 찰

대부분의 암은 수술적 적출술, 근접 방사선 치료 또는 외부 방사선 치료 같은 국소적 치료법, 항암 화학 요법, 면역 요법, 호르몬 요법 등과 같은 전신적 치료법이 단독 또는 병용 요법으로 암치료에 이용되는게 가장 효과적인 치료법으로 알려져 있다. 그러나 이중에서 수술적 적출술은 광범위 절제술이나 근치적 절제술로 제거하여줌으로써 환자가 암세포의 수가 적어지는 조건을 만들어준 후, 다른 국소적 치료나 전신적 치료를 실시하여 치료 효과를 극대화하는 가장 효과적인 방법의 하나로 알려져 있다.

이때 미세 전이나 원격 전이된 암 세포를 궤멸시키기 위하여는 전신 항암 화학 치료를 병용하는 치료법이 우수한 치료 방법으로 알려져 있다. 그러나 전신 투여를 목적으로 각종 항암제를 정맥 주사하는 방법은 우수한 치료 효과에도 불구하고 많은 부작용이 뒤따르는게 단점으로 알려져 있으며, 이런 심각한 부작용으로 말미암아 최대 용량의 항암제를 사용하는데 제한이 따르기 마련이다. 항암제 투여 후 흔하게 발생되는 부작용으로는 골수 억제, 점막염, 탈모, 심장 독성 등이 발생되는데, 이중에서도 특히 골수 기능 저하로 암환자의 면역 기능 억제가 발생되어 이차적인 감염 등으로 사망에 이르게 하거나 혈소판 감소 등으로 뇌출혈 등의 심각한 부작용이 발생되기도 한다. 또한 부작용으로 인하여 암의 치료 효과에 미달하는 농도의 항암제를 투여하거나 항암제 투여 간격이 길어져 dose intensity가 떨어져 종종 항암 치료 효과가 반감된다고 보고하였다.

골육종에서 각종 항암제의 단독 투여시 관해율을 살펴보면 고용량의 메토트렉세이트(methotrexate; 8~12g/㎡)는 leukovorin과 함께 투여시 50%의 관해율, 독소루비신(doxorubicin; 90㎎/㎡) 투여시 30%의 관해율, 씨스플라틴(cisplatin; 120㎎/㎡) 투여시 20%의 관해율, 이포스포마이드(ifosfamide; 6~14g/㎡) 투여시 25%의 관해율을 보여주어, 대개의 경우 골육종의 항암제 선택시 이들 항암제중에서 병용 요법을 실시하여 좋은 치료 결과를 얻을 수 있었다. 이들 대부분은 항암제 용량이 증가시 골육종 치료에 대한 효과가 증가된다고 알려져 있으며, GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor)를 함께 투여하여 골수 억제 기능을 감소시켜 항암제 용량을 높여 좋은 결과를 얻었다는 보고가 있었다. 최근에는 정맥내 항암제 투여로 인한 후유증을 극복하기 위하여 동맥내 항암 치료법이 개발되어 종양 혈관내 항암제를 최대한 투여하여, 가능하면 암조직에는 고농도의 독소루비신 또는 씨스플라틴 등의 항암제가 도달하게 되어, 높은 항암제의 국소 농도를 유지할 수 있으며 종양의 괴사 효과가 증대되어 수술전 항암 치료의 성적을 향상시킬 수 있다고 보고하였다.

한편 국소적 항암제 투여 방법의 하나로 지혈대를 사용한 후 일정한 농도의 항암제를 국소적으로 투여하는 방법으로, 체외 순환기인 인공 심폐기를 이용한 hyperthermic perfusion 방법으로 환지에 국소적으로 고농도의 항암제 투여 방법을 시도하였으나, 대퇴 동맥 혈전증, 일과성 비골 신경 마비, 하퇴부의 일과성 구획 증후군 등의 부작용을 초래하여

국소 항암치료 방법의 한계내지는 극복해야 될 문제점들로 대두되었다.

만성 골수염 치료에서 항생제 함유 골시멘트의 효용성에 대하여는 Buchloz 및 Engelbrecht(1970)에 의해 처음 제안된 이래, Medcraft 및 Gardner (1974)가 Simplex P 40g에 항생제 푸시딘(Fucidin) 250㎎을 섞은 골시멘트를 사용하여 좋은 결과를 얻었다는 보고가 있었으며, 수많은 연구자들에 의해 그 효능성에 대하여 발표된 바 있었다. 사용된 골시멘트 종류에도 Simplex P, CMW 3, Palacos R, LVC 등이 이용되었고, 사용된 항생제는 골시멘트가 polymerization하는 동안 발생되는 열(3㎜ 두께: 60 C; 10㎜ 두께: 107 C)에서도 변형이 없는 안정된 항생제[5,6,9,12]가 이용되었는데 여기에는 겐타마이신(gentamicin), 에리쓰로마이신(erythromycin), 테트라싸이클린(tetracycline), 메치실린(methicillin), 쎄팔로스포린(cephalosporin), 클린다마이신(clindamycin), 반코마이신(vancomycin) 등이 있으며, 항생제가 용출되어 효과적인 기간도 수일에서 60일까지 보고되고 있어, 항생제를 골시멘트에 섞어 사용할 경우 신체내에서 지속적으로 항생제가 용출된다는 것은 이미 알려진 사실이다. 항생제가 골시멘트에서 용출되는 기전으로 기질(matrix)을 통한 확산, 골시멘트 내의 기공을 통한 방출, 골시멘트 표면에서의 용출 등이 가설[16]로 제시되고 있는 실정이나 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

최근에 메토트렉세이트를 골시멘트에 섞어 실험실에서 연구 결과 메토트렉세이트가 지속적으로 용출된다는 보고[2-4,8,10,11,13-15]가 있은 이래, 아드리아마이신[15], 씨스플라틴[7,15], 5-Fluorouracil[4]을 골시멘트에 섞어 실험한 결과에 대하여 드물게 보고하고 있다. 저자들은 이중에서 골에 발생되는 악성 종양중에서 가장 흔한 골육종의 국소 항암 요법에 대한 연구 결과가 없고, 아드리아마이신 함유 골시멘트에 대한 연구 또한 아주 드물고, 골육종에 단독 투여시 관해율이 다른 항암제에 비하여 비교적 높은 아드리아마이신을 연구 대상으로 삼았다. 아드리아마이신은 anthrcyclines의 하나로 주로 고형암의 치료제로 사용되고 있다. 아드리아마이신의 세포막 이동(transmembrane movement)은 비이온화 약제(un-ionized drug)의 자유로운 확산에 의하여 이루어지거나 능동적 유출(active efflux)에 의하여 약제 이동이 이루어진다고 알려져 있으며, 독성으로는 골수 억제, 점막염, 심장 독성 등이 알려져 있다. 아드리아마이신의 혈관외 유출은 홍반, 경화, 감염, 동통, 피부 괴사 등으로 알려져 있으며, 그 치료는 약물 주사 중단, 약물 흡인, 얼음 주머니 적용을 실시한다.

저자들은 Palacos R, LVC, CMW 3, Simplex P 등의 4종류의 골시멘트에 그람당 아드리아마이신 농도를 각각 2.5㎎, 5㎎, 25㎎, 주위 환경을 ddH20, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수에 의하여 항암제 함유 골시멘트를 배양하여 용출되

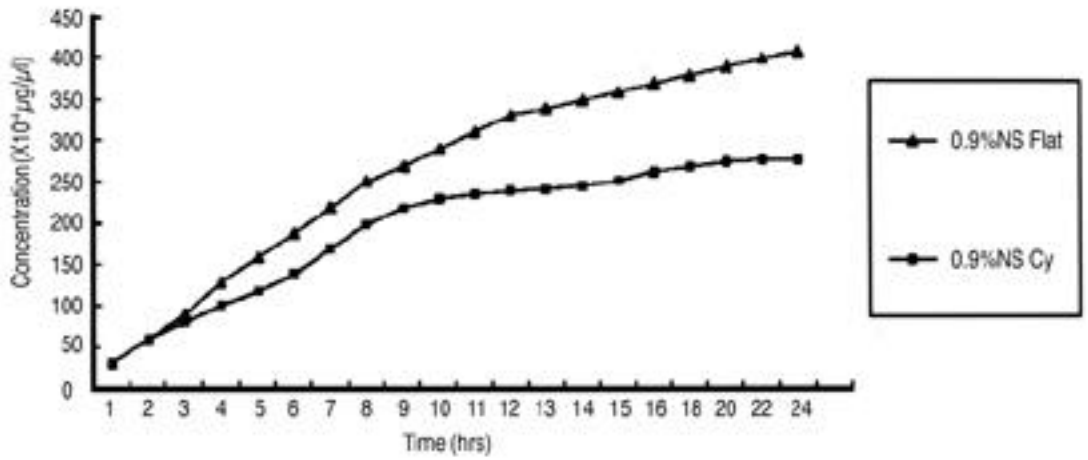

Fig. 1. Differences of adriamycin concentrations eluted from 2.5㎎ of adriamycin-impregnated Palacos R bone cement between the flat and cylindrical shape.

는 항암제의 농도를 측정하였다. 또한 용출된 항암제 아드리아마이신의 골육종 세포주인 Saos-2의 세포 독성에 대하여 실험하였다.

골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출의 차이는 납작한 모양의 골시멘트 펠릿에서 원주형 모양보다 아드리아마이신 용출이 더 많았다(p=0.003)(Fig. 1). 골시멘트 주변 환경에 따른 아드리아마이신 용출의 차이는 3% 식염수, 0.9% 식염수, 0.45% 식염수의 순으로 항암제 용출이 증가되었다가 감소되었으며, ddH2O에서는 거의 항암제가 용출되지 않았다. 배양 시작 1시간부터 13시간까지 ddH2O에 비하여 0.9%, 3% 식염수가 차이를 보여주었고(각각

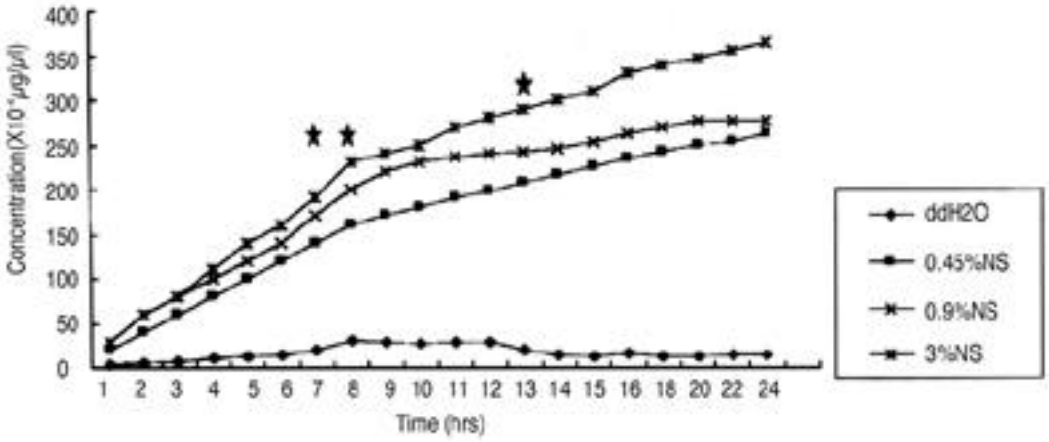

Fig. 2. Differences of adriamycin concentrations eluted from 2.5㎎ adriamycin-impregnated Palacos R bone cement under the four different environmental solutions(3%, 0.9%, 4.5% saline & ddH2O, respectively).

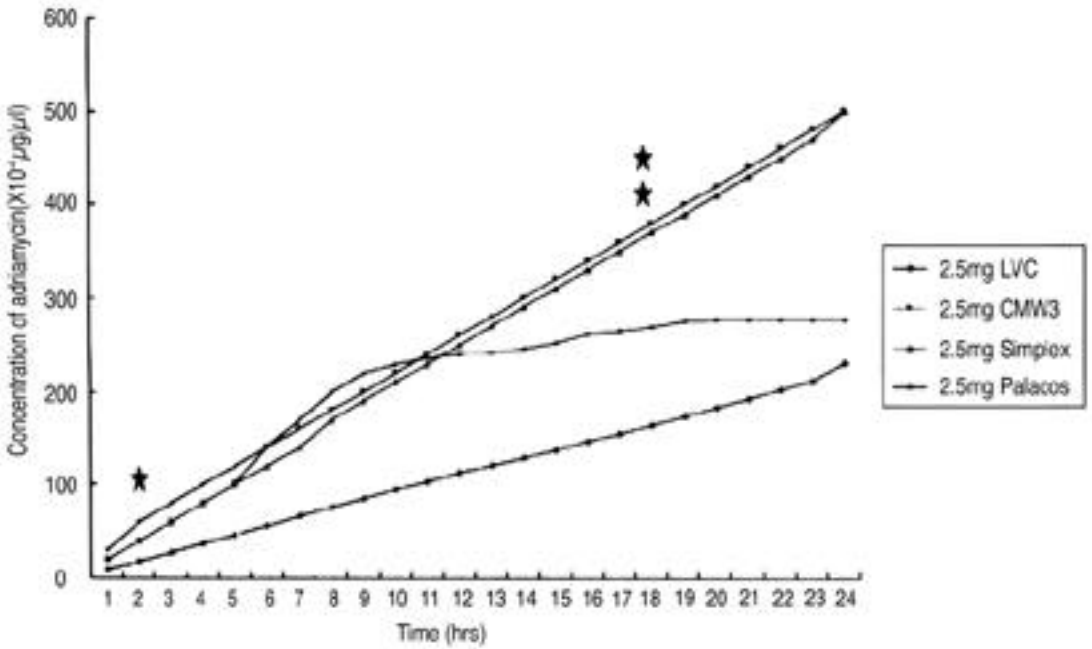

Fig. 3. Differences of adriamycin concentrations eluted from CMW 3, Simplex P, Palacos R or LVC.

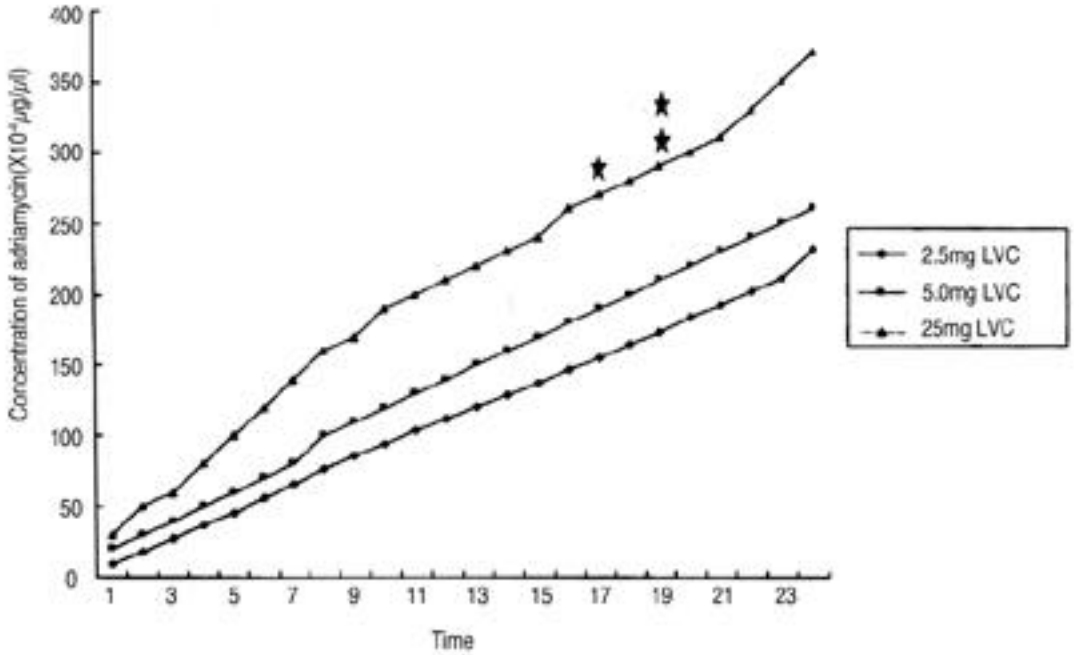

Fig. 4. Differences of adriamycin concentrations eluted from 2.5㎎, 5㎎ or 25㎎ adriamycin-impregnated LVC bone cement.

p=0.028, 0.008), 배양 시작 7시간이 경과된 다음에는 ddH2O에 비하여 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수가 다른 차이를 보여주었고(각각 p=0.048, 0.022, 0.009), 배양 13시간 이후에는 ddH2O에 비하여 3% 식염수만이 차이를 보여주었다(p=0.015)(Fig. 2). 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출의 차이는 CMW 3, Simplex P가 Palacos R, LVC보다 항암제 용출이 많았다. 배양 2시간부터 LVC와 다른 골시멘트 종류와 차이를 보이는 것으로 나타났고(p<0.023), 배양 18시간 이후 Palacos R과 CMW 3, Simplex P가 차이를 보이는 것으로 나타났다(p<0.01)(Fig. 3). 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출의 차이는 polymethylmethacrylate의 구성 성분의 차이이거나 제조 회사들이 밝히기를 거부하는 다른 성분의 차이일지도 모르나, 그 원인은 확실하지 않은 것 같다. 골시멘트(LVC)에 함유된 아드리아마이신의 농도가 25㎎, 5㎎, 2.5㎎의 순으로 항암제 용출이 증가되었다가 감소되었으며, 배양 17시간 이후 아드리아마이신 2.5㎎과 25㎎ 사이에서 차이를 보여주었고(p=0.04), 배양 19시간 이후에는 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎과 차이를 보여주었다(각각 p=0.043, 0.024)(Fig. 4).

골종양 세포주 Saos-2를 McCoy 5a에 48시간 배양하여 아드리아마이신 함유 골시멘트(LVC)와 아드리아마이신이 함유되지 않은 골시멘트(LVC)를 각각 배양한 결과 세포 생존율은 Saos-2를 단독 배양한 결과를 100%라고할 때, 골시멘트만 넣고 배양한 경우 26%, 골시멘트에 아드리아마이신 2.5㎎, 5㎎, 25㎎을 각각 사용한 경우 5%, 2%, 1%이었고, 각각 세포 독성도는 95%, 98%, 99%로 나타났으며, 시멘트만 사용한 경우에도 세포 독성도가 74%가 되었다(Fig. 5). 이는 골시멘트의 구성 성분중 methyl methacrylate monomer의 독성으로 사료되었으며, 골시멘트가 polymerization하는 동안 고열이 발생되는데, 아드리아마이신 함유 골시멘트의 실험실(***in vitro***) 실험 결과 골육종 세포주 Saos-2 독성 실험에 유효한 것으로 나타났으며, 결국 아드리아마이신은 고열에 변성이 일어나지 않고 견디는 것으로 입증되었다.

결 론

아드리아마이신이 함유된 골시멘트에서 유리되는 아드리아마이신은 실험실 실험에서 골육종 세포주 Saos-2에 세포 독성이 확인되었다. 향후 주위 정상

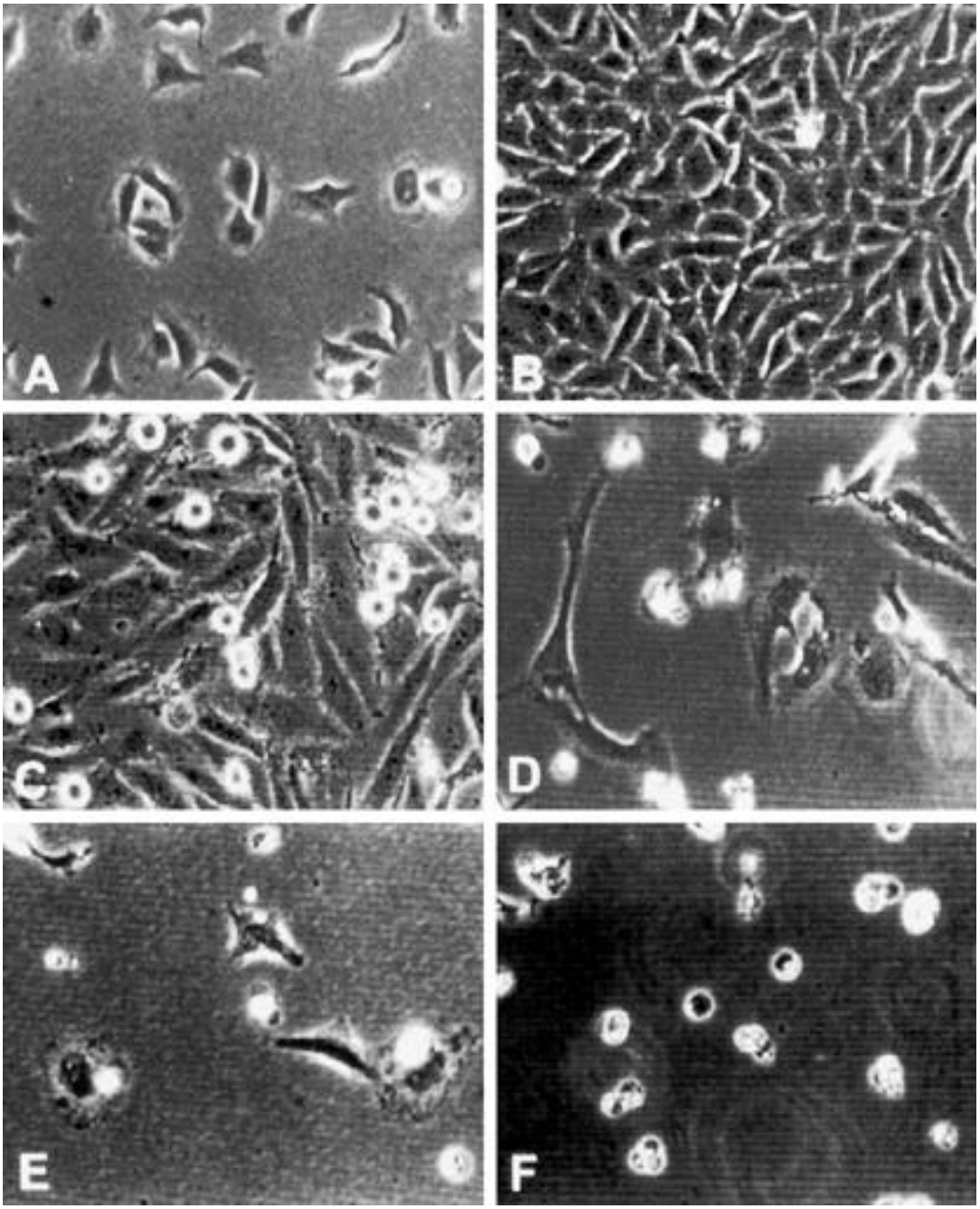

Fig. 5-A. Saos-2(7.5×10^5 cells) at initial culture

B. Confluent cells of Saos-2(238×10^4 cells)

C. Saos-2 with LVC cement(62×10^4 cells)

D. Saos-2, cultured with 2.5㎎ of adriamycin-impregnated LVC cement (12.5×10^4 cells) and cellular shrinkage and cell death

E. Saos-2, cultured with 5㎎ of adriamycin-impregnated LVC cement (5.4×10^4 cells)

F. Saos-2 with 25㎎ of adriamycin-impregnated LVC cement (1.6×10^4 cells) at 48 hours after initial culture($\times100$).

조직에는 최소한의 독성을 나타내는 아드리아마이신 농도가 생체 실험에서 결정된다면, 전신적 항암 요법과 병용하여 골육종 또는 전이성 골암 등에서 좋은 효과를 기대할 수 있으리라 사료되었다. 특히 정형외과 영역에서 광범위 절제술 후 흔하게 사용되는 재건술 방법인 동종골 이식술이나 종양 대치물 고정 목적으로 골시멘트를 사용할 경우, 사용되는 골시멘트에 아드리아마이신을 적정한 수준으로 이용한다면, 항암 치료 효과를 극대화 시킬 수 있으리라 사료되었으며, 말기 암환자들의 경우처럼 환자 상태가 광범위 절제술과 같은 적극적인 치료를 받기 힘들 경우 보존적 치료 방법의 하나로 아드리아마이신 함유 골시멘트를 시술하는 치료 방법이 보조적인 치료 수단으로 이용될 수 있으리라 사료되었다.

REFERENCES

1) **Bayston R and Milner RDG** : The sustained release of antimicrobial drugs from bone cement. *J Bone Joint Surg*, 64-B:460-464, 1982.
2) **Chabner BA and Young RC** : Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues. *J Clin Invest*, 52:1804-1811, 1973.
3) **Degrief J, Rudigier J, Rudig L, Wahlig H and Dingeldein E** : Reaction of the bone structure to methotrexate-palacos Flow y. *Arch Orthop Trauma Surg*, 108:363-367, 1989.
4) **Dekel S, Wasserlauf S, Salama R, Warshawsky A and Mazar Y** : The release of anti-neoplastic drugs from acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg*, 67-B:845-846, 1985.
5) **Eyerer P and Jin E** : Influence of mixing technique on some properties of PMMA bone cement. *J Biomed Mater Res*, 20:1057-1094, 1986.
6) **Guan WY, Yi WT, Zhi MY and Zhen SS** : Experimental research on the use of an antineoplastic drug with a bone cement. *Int Orthop*, 14:387-391, 1990.
7) **Greco F, Palma L, Specchia N, Jacobelli S, and Gaggini C** : Polymethylmethacrylate-antiblastic drug compounds: an *in vitro* study assessing the cytotoxic effect in cancer cell lines-A new method for local chemotherapy of bone metastasis. *Orthopade*, 15:189-194, 1992.
8) **Hernigou PH, Thiery JP, Benoit J, Voisin MC, Lerroux P, Hagene G, Delepine G and Goutallier D** : Methotrexate diffusion from acrylic cement. *J Bone Joint Surg*, 71-B:804-811, 1989.
9) **Hill J, Klenerman L, Trustey S and Blowers R** : Diffusion of antibiotics from acylic bone-cement in vitro. *J Bone Joint Surg*, 59-B:197-199, 1977.
10) **Isacoff WH, Morrison PF, Aroesty J, Willis KL, Block JB and Lincoln TL** : Pharmacokinetics of high-dose methotrexate with citrovorum factor rescue. *Cancer Treat Rep*, 61:1665-1674, 1977.
11) **Kirchen ME, Medendez LR, Lee JH, and Marshall GJ** : Methotrexate eluted from bone cement. *Clin Orthop*, 328:294-303, 1996.
12) **Meyer PR Jr, Lautenschlager EP, Moore BK** : On the setting properties of acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg*, 55A:149-156, 1973.
13) **Park JM, Moon CH and Lee MG** : Pharmacokinetic changes of methotrexate after intravenous administration to streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Res Commu Mol Pathol Pharmacol*, 93(3):343-352, 1996.
14) **Park JM, Moon CH and Lee MG** : Pharmacokinetic changes of methotrexate after intravenous administration to uranyl nitrate-induced acute renal failure rats. *Res Commu Mol Pathol Pharmacol*, 93(3):353-362, 1996.
15) **Wasserlauf S, Warshawsky A, Arad-Yelin R, Mazur Y, Salama R and Dekel S** : The release of cytotoxic drugs from acrylic bone cement. B *Hosp Joint Dis Ort*, 53(1):68-74, 1993.
16) **Wang HM, Galasko CSB, Crank S, Oliver G and Ward CA** : Methotrexate loaded acrylic cement in the management of skeletal metastasis. *Clin Orthop*, 312:173-186, 1995.
17) **Ekstrom PO, Andersen A, Warren DJ, Gierccksky KE and Slordal L** : Pharmacokinetics of different doses of methotexate at steady state by in situ microdialysis in a rat model. *Cancer Chemoth Pharm*, 36:283-289, 1995.
18) **Brimmell PA and Sams DJ** : Rapid and simple assay for the measurement of methotrexate in serum, urine and red blood cells by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*, 413:320-325, 1987.

Abstract

Cellular Toxicity of Adriamycin Eluted from Adriamycin-impregnated Bone Cement

Dong-Wook Jang, M.D., Dongsin Lee-Yoon, Ph.D., Sunsil Choi, Seung-Jun Choi, M.D., Soo-lk Awe, M.D., and Byoung-Suck Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Purpose : To elucidate possibility of local chemotherapy from adraimycin-impregnated bone cement.

Materials and Methods : Authors used 4 kinds of bone cements, Palcos R, LVC, CMW 3, Simplex P for this experimental model, included 2.5㎎, 5㎎, 25㎎ of adriamycin, respectively. We compared the differences of eluted-adriamycin concentrations between the cylindrical shape and the flat shape of bone cements, between ddH2O, 0.45% saline, 0.9% saline, and 3% saline as one of environmental conditions. Osteosarcoma cell line, Saos-2 were cultured under 37。C, 5% CO_2 in the humidified incubator with three different concentrations of adriamycin-impregnated bone cements and cellular toxicity of adriamycin eluted from bone cement was analysed according to MTT assay.

Results : Authors noticed the flat shape of bone cement eluted more concentrations of adriamycin than the cyclindrical shape, bone cement immersed in 3% saline, more than 0.9% or 0.45% saline. Concentrations of adriamycin eluted from CMW 3 or Simplex R were more than Palacos R or LVC. Saos-2 were cultured with 2.5㎎, 5㎎, 25㎎ of adriamycin-impregnated bone cement, respectively, and their cellular toxicity were 95%, 98%, 99%, each.

Conclusion : Adriamycin-impregnated bone cement can be one of anticancer-drug delivery sytems as possible local chemotherapy.

Key Words : Adriamycin-impregnated bone cement, Local chemotherapy

Address reprint requests to
Byoung-Suck Kim, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Ajou University School of Medicine
#5 San, Wonchon-dong, Paldal-gu, Suwon, 442-749, Korea
Tel : 82-31-219-5224, Fax : 82-31-219-5229, E-mail : bskim@madang.ajou.ac.kr