

인체폐암세포 조직배양계(histocultures)에서 티라파자민의 약력학

박종국 · 구효정[†]

가톨릭대학교 의과대학 생명과학과
(2006년 6월 16일 접수 · 2006년 7월 24일 승인)

Pharmacodynamics of Tirapazamine in Histocultures of a Human Lung Adenocarcinoma Xenograft

Jong-Kook Park and Hyo-Jeong Kuh[†]

Dept. of Biomedical Sciences, College of Medicine, The Catholic Univ. of Korea, Seoul 137-701, Korea
(Received June 16, 2006 · Accepted July 24, 2006)

ABSTRACT – Hypoxia in solid tumors is known to contribute to intrinsic chemoresistance. Histocultures are *in vitro* 3 dimensional cultures of tumor tissues and maintain the characteristic microenvironment of human solid tumors *in vivo* including hypoxia and multicellular structure. In this study, we evaluated the pharmacodynamics of tirapazamine (TPZ), a hypoxia-selective cytotoxin, in human non small cell lung cancer (NSCLC) cells grown as monolayers and histocultures. Antiproliferative activity of TPZ was determined after various conditions of drug exposure, and cell cycle arrest and apoptosis were also measured using flow cytometry. In monolayers, hypoxia selectivity measured by hypoxic/normoxic cytotoxicity ratio was increased with longer exposure. Lower cytotoxicity of TPZ was observed in histocultures compared to monolayers, however, a similar level of cytotoxicity was obtained with longer exposure of 96 hr. TPZ induced G₂/M arrest and apoptosis in both culture conditions, which were greatly enhanced under hypoxic condition. Our data clearly showed the different pharmacodynamics of TPZ in monolayers and histocultures. Antiproliferative activity of TPZ against human solid tumors can be improved with longer drug exposure by exploiting drug delivery systems or by combining angiogenesis inhibitors to maintain drug concentration in tumor tissues.

Key words – Tirapazamine, Histocultures, Cell cycle, Apoptosis, Pharmacodynamics

인체 고형암의 미세환경(microenvironment)은 생리, 병리학 적 현상들에 있어서 중요한 역할을 담당하며 이로 인해 약물 에 대한 감수성/내성에 크게 영향을 미친다. 즉, 미세환경내 에 존재하는 세포간의 작용(cell-cell interaction), 세포와 세포 외기질(extracellular matrix)과의 작용은 분화(differentiation), 성장(proliferation), 세포사멸(apoptosis), 그리고 신혈관생성 (angiogenesis) 등과 같은 세포의 기능에 필수 불가결한 요소 이다.^{1,2)} 단층세포배양계(monolayers)는 암세포에 대한 항암 제의 효능연구를 위해 가장 널리 쓰이는 실험모델이기는 하 지만 인체고형암의 삼차원적 구조에 기인하는 이러한 미세 환경 및 구조적 복잡성을 나타내지 못하기 때문에 항암효능 및 기전과 관련된 임상적으로 유용한 데이터를 제공하는 데 는 한계가 있다.

최근 이러한 인체고형암의 특성을 잘 유지할 수 있는 다 세포구상체(spheroids)나 조직배양계(histocultures) 같은 삼차

원세포배양계(3-dimensional cell culture systems)가 다세포 내성(multicellular resistance)과 항암제 및 방사선 기전 및 치료연구 등의 분야에 중요한 모델로서 부각되고 있다.³⁻⁵⁾ 이 중 조직배양계는 암조직절편을 *in vitro*에서 배양함으로써 세 포간의 작용 및 세포와 세포외기질과의 상호작용을 유지할 수 있기 때문에⁶⁾ 임상적 의미와 응용성에 대해 긍정적인 결 과들이 많이 보고되고 있다.⁷⁻⁹⁾ 따라서 이러한 조직배양계는 기존의 또는 새로운 항암제의 약물약력학(pharmacodynamics) 연구뿐 아니라 종양조직내 약물의 침투/분포 등의 약동학적 연구에도 적합한 실험계이다.

고형암에서 나타나는 저산소증(hypoxia)이 약물이나 방사 선 치료내성의 주요 기전인 동시에 선택적 타겟으로 인식되 면서 저산소환경에서 선택적 독성을 유발할 수 있는 약물들 이 개발되고 있다. 티라파자민(Tirapazamine, TPZ, 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-di-N-oxide)은 이러한 약물중 하나로 저산소환경하에서 여러 인체 암세포주에 대한 선택적인 항 암독성작용이 보고되었다.¹⁰⁾ 티라파자민은 저산소환경에서 세포내 여러 가지 환원효소(reductase)들에 의해 라디칼

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)590-2422, E-mail : hkuh@catholic.ac.kr

(radical)로 전환되어 DNA 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾

본 연구의 목적은 단층세포배양계와 삼차원세포배양계인 조직배양계(histocultures)에서 TPZ의 약력을 비교 평가하는 것이다. 이 약물에 대한 많은 연구들이 이루어져 왔으나 삼차원적 배양계를 이용한 연구결과는 미비하며 세포주기 저해효과와 세포자연사 또는 전체 항증식효과와의 상관성에 관한 연구결과도 보고되지 않은 실정이다. 본 연구에서는 인체 폐암세포주의 이식편을 조직배양하여 삼차원배양된 암세포에서 약물투여 후 항증식효과, 세포주기 저해 및 세포자연사 유도의 약물약력을 분석하였다.

실험 방법

시약 및 재료

티라파자민은 Sanofi Aventis(Malvern, PA, 미국)에서 제공 받았다. 티라파자민은 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 용해시키고 세포배양배지를 이용하여 희석하였다. Collagen gel(SPONGOSTAN[®])은 Johnson & Johnson Medical(서울, 한국)에서 구입하였으며 collagenase 및 기타 시약은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양조건

세포주는 인체 비소세포폐암인 A549 세포주를 이용하였으며 ATCC(Manassas, VA, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 37°C, 5% CO₂ 및 항습조건하에서 스트렙토마이신(100 mg/ml), 페니실린(100 units/ml)과 10% 불활화 fetal bovine serum(FBS)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지를 이용하였다. 저산소환경 실험을 위해서는 배양기(모델 3131, CO₂ water jacketed incubator, Forma Scientific Inc, Ohio, 미국)에 질소를 주입하여 산소 농도(O₂ tension)를 2.0%로 유지하여 주었다.

단층세포배양계에서의 항증식효과 측정

세포독성 측정은 문헌에 보고된 방법을 따라 수행하였다.¹⁴⁾ 약물투여 24시간 전 세포를 1000 cells/well 단위로 96-well plate에 분주하였다. 티라파자민은 여러 농도범위(0.4, 1, 4, 10, 40, 100, 400, 600, 1000 µM)에 일정시간까지 노출시킨 후 약물이 포함된 배지를 제거하고 약물이 포함되지 않은 배지를 재첨가 하여 96시간까지 재배양 하였다. 이렇게 96시간에 지연되어 나타나는 세포독성 효과를 3-(4,5-dimethyl(thiazol-2-yl))-3,5-diphenyltetradium bromide(MTT) assay방법으로 측정하였다.

Human tumor xenograft를 이용한 조직배양계의 수립

A549 인체비소세포 폐암 세포주를 이용하여 이종이식모델(xenograft model)을 수립하였다. 배양된 세포를 트립신 처리하여 수집한 후 FBS가 첨가되지 않은 배지로 2회 수세한 후 5~6×10⁶ cells/0.2 ml serum-free media의 조건으로 25 케이지 주사기를 이용하여 마우스의 좌, 우측 견부 상단에 피하주입하였다. 마우스는 Balb/c nu/nu(Japan SLC, Inc, Shizuoka, 일본)를 구입하여 사용하였으며 암조직의 크기가 평균 800~1000 mm³ 정도의 크기로 성장했을 때 마우스를 경추탈골로 안락사 시킨 후 조직을 채취하였다. 얻은 조직의 과사부분 등을 제거하고 성장가능한 부분을 0.5~1 mm³의 조각(tumor piece)으로 자른 후 24-well내 미리 배지에 적셔진 collagen gel(1 cm² 크기)위에 4-5개의 조각을 올려놓아 배양하였다. 배양액의 조성은 단층세포배양방법과 동일하나 배양배지에 90 µg/ml의 cefotaxime sodium을 추가적으로 첨가하여 사용하였다.

조직배양계에서의 항증식효과 측정

조직배양계에서의 세포독성의 측정은 Furukawa *et al.*¹⁵⁾의 방법을 적절하게 수정하여 수행하였다. 간단히 기술하면, 24, 48, 96시간 동안 여러 농도 범위의 티라파자민(7, 28, 70, 140, 280, 420, 700 µM)에 노출시킨 후 약물을 포함한 배지를 제거하고 약물이 포함되지 않은 배지로 96시간까지 재배양 하였다. 약물노출이 종료된 후 MTT assay를 이용하여 남은 세포의 생존능력을 분석하였다. 최종 측정시간에 0.06% collagenase, 0.2% MTT solution을 각각 100 µl씩 첨가하고 20시간 동안 배양 하였다. 이 후 각 well내의 배지를 제거하고 tumor piece에 1 ml의 DMSO를 첨가하여 조직절편과 함께 생성된 포마즌 결정(formazan crystal)을 용해시켰다. 이 용액 200 µl 채취하여 96-well plate에 옮긴 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 배양 전 중앙조직절편들의 무게(mg)에 대해 보정해 주어 각 샘플 당 포함된 조직의 양에 따른 실험오차를 보정해 주었다.

세포주기의 측정

세포주기 분포의 분석을 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 150 mm 원형 세포배양접시에 배양된 세포를 여러 농도 범위의 티라파자민(7.8, 21, 31.3, 83 µM)에 12~48시간 동안 노출시킨 후에 트립신을 처리하여 세포를 수집한 후 차가운 PBS로 수세하였다. 배양된 조직절편도 48시간과 96시간 동안 35 µM와 97 µM 농도의 티라파자민 투여 종료 후에 트립신을 이용하여 단일세포로 해리시킨 후 차가운 PBS로 수세하였다. 세포부유액에 70% cold ethanol 10 ml을 가하여 고정한 후 분석 시 까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

분석당일 고정된 샘플을 PBS로 2회 수세 후 50 µg/ml의 RNase A와 50 µg/ml의 ethidium bromide 용액 1 ml과 혼합하여 37°C에서 15~20분 동안 반응시켰다. DNA content의 분석은 유세포분석기(FACSVantage™, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, 미국)를 이용하였으며 세포주기 분석을 위해서는 ModFit LTTM(Verity Software House Inc, Topsham, ME, 미국)을 이용하였다.

세포자연사의 측정

세포주기와 세포자연사의 동시측정 실험을 수행하기 위해 TUNEL assay(Apo-Direct™ kit, Pharmingen Co, San Jose, CA, 미국)를 사용하였으며 제조사에 의해 제공된 방법에 따라 실험을 수행하였다. 약물 노출 후 세포의 수집은 세포주기 측정시와 같은 방법으로 수행하였으며 이후 1.0%(w/v) paraformaldehyde를 첨가하여 얼음위에서 15분 동안 고정한 후, PBS로 2회 수세하여 70% ice-cold ethanol에 부유시켜 분석당일까지 -20°C 냉동고에 보관하였다. 분석당일 샘플을 1 ml PBS로 2회 수세한 후 반응 완충액에 terminal deoxynucleotidyltransferase와 FITC-conjugated d-UTP deoxynucleotide가 1:1로 함유된 용액 50 µl를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 0.1% triton X-100이 포함된 PBS로 수세 후 5 µg의 propidium iodide(PI)와 10 ku RNase가 포함된 PBS용액을 0.5~1 ml 정도로 첨가하여 37°C에서 재반응 시켰다. 유세포분석기를 이용하여 세포자연사를 나타내는 FITC(FL1 gate)와 DNA content를 나타내는 PI(FL2 gate)를 동시측정하였으며 CellQuest 소프트웨어(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, 미

국)를 이용하여 데이터를 얻었다.

데이터의 분석

세포성장 억제율은 Kalns JE *et al.*¹⁶⁾에 보고된 방법을 따라 수행하였다. 식 1을 이용하여 구하였으며 이 결과에 E_{max} 모델(식 2)를 적용하여 각 약물의 항증식 효과에 대한 K_d 및 저항분율 등의 파라미터를 산출하고 이로부터 IC₅₀을 구하였다.

$$\%Growth = \left(\frac{\text{absorbance of treated samples}}{\text{absorbance of control samples}} \right) \times 100 \quad (\text{식 1})$$

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

여기에서 [D]는 약물 농도, K_d는 최대세포증식 억제율 (E_{max}=100-R)의 50%를 감소시키는 약물 농도, m은 Hill-type coefficient 및 R은 저항 분율(residual unaffected fraction, the resistance fraction)이며 모델 파라미터는 SigmaPlot (SYSTAT software Inc, Richmond, CA, 미국)을 이용하여 산출하였다.

결 과

티라파자민의 항증식효과

A549 세포주의 단층세포배양계와 삼차원배양계인 조직배양계에서 티라파자민의 노출시간에 따른 세포독성을 Figure 1에 약물농도-반응 곡선(dose-response curve)으로 나타내었다.

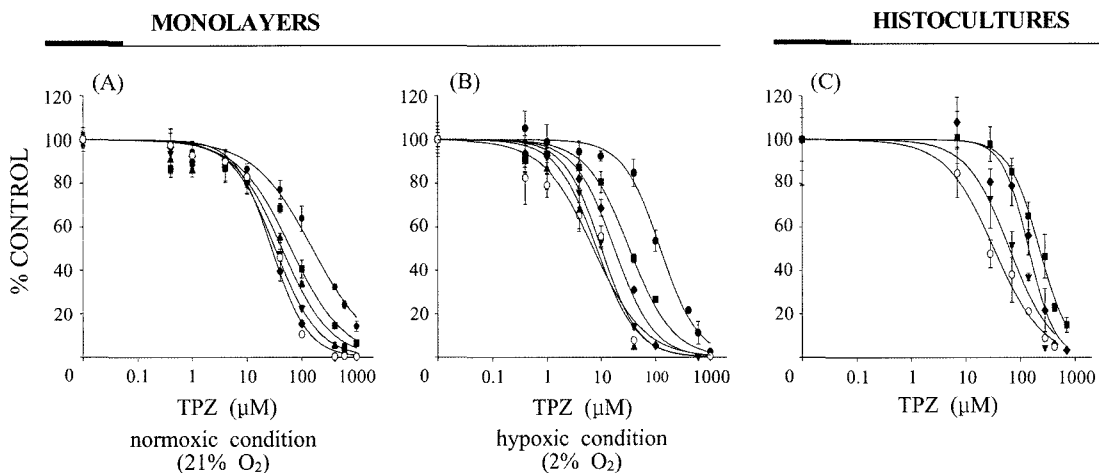


Figure 1—Dose-response curves of antiproliferative activity of tirapazamine in A549 cells grown as monolayers under normoxic (A), or hypoxic (B), and as histocultures (C) grown on collagen gel. Cytotoxicity was determined after incubation in drug free medium until 96 hr following respective treatment durations. For example, the cytotoxic effect of the 6 hr treatment was measured after a 90 hr delay. Symbols are ●, 6 hr; ■, 12 hr; ◆, 24 hr; ▼, 48 hr; ▲, 72 hr; ○, 96 hr.

Table I—Antiproliferative Activity of TPZ in A549 Cells Grown in Monolayers (Under Normoxic and Hypoxic Condition) or Histocultures of Human Tumor Xenograft

Parameters	Treatment time (hr)						
	6	12	24	48	72	96	
Monolayers	N [†]	145±179	60.7±4.0	42.7±1.3	31.9±1.1	27.4±1.3	38.4±8.8
	H [‡]	120±3.6 ^a	33.9±1.0 ^a	18.3±0.9 ^a	9.3±1.2 ^a	8.4±0.1 ^a	8.1±2.2 ^a
	HCR	1.2	1.8	2.3	3.4	3.3	4.7
Histocultures	IC ₅₀ (μM)	228.3±10.3	140.9±10.8	ND	82.2±17.4	ND	38.1±5.0

Each value represents the mean±S.D. of three independent experiments.

^aStatistically significant (P<0.01) differences between IC₅₀'s of TPZ under hypoxic (2% O₂) vs. normoxic conditions.

N[†] normoxic condition (21% O₂)

H[‡] hypoxic condition (2% O₂)

ND, not determined

Table I은 노출시간에 따른 약물약력 파라미터를 정리해 놓은 것이다. 단층세포배양계에서 티라파자민의 세포독성은 정상산소분압(21% O₂)과 저산소분압(2% O₂)에서 약물투여 시간의 증가에 따라 세포독성이 지속적으로 증가하는 것으로 관찰되었으며, HCR(Hypoxic Cytotoxic Ratio, 정상산소분압과 저산소분압에서의 IC_x값의 비율)의 증가 또한 관찰되었다. 6시간에서 96시간으로 약물노출시간 증가에 따라 HCR은 1.2에서 4.7로 증가되었으며 이것은 약물노출시간의 증가에 따라 저산소분압세포에 대해 선택적 독성이 유도될 수 있음을 나타내주는 것이다.

조직배양계에서는 12시간의 비교적 짧은 약물처리시간에도 불구하고 저항분율은 관찰되지 않았으며(결과 미제시), 96시간 노출 후에는 단층세포배양계에서의 IC₅₀값과 비슷한 수치를 나타내었다(Table I).

단층세포배양계와 조직배양계에서 세포주기저해와 세포자연사 유도

단층세포배양계와 조직배양계에서 티라파자민에 의해 유도되는 세포주기 분포변화와 세포자연사를 약물농도, 산소분압 및 노출시간의 변화에 따라 추이를 관찰하고 이 두 효과간의 상관관계를 살펴보았다(Figure 2와 3). 단층세포배양계에서는 정상산소분압(21% O₂) 및 저산소분압(2% O₂) 환경하에서 G₂/M 세포주기억제 효과가 관찰되었다. 정상산소분압에서 티라파자민의 농도증가에 따라 G₂/M주기 축적이 증가되어 21 μM/48시간 처리 시 약 40%, 83 μM/48시간 처리 시 80%의 세포가 G₂/M주기에서 억제됨을 관찰되었다(Figure 2A와 2B). 저산소분압에서는 정상산소분압에서보다 더욱 큰 저해효과를 보여 8 μM/48시간 처리에서 약 60%의 세포가 G₂/M 주기에서 관찰되었으며(Figure 2C), 또한 저산소분압에서 고농도(31.3 μM)의 티라파자민 처리 시 G₂/M 축적과

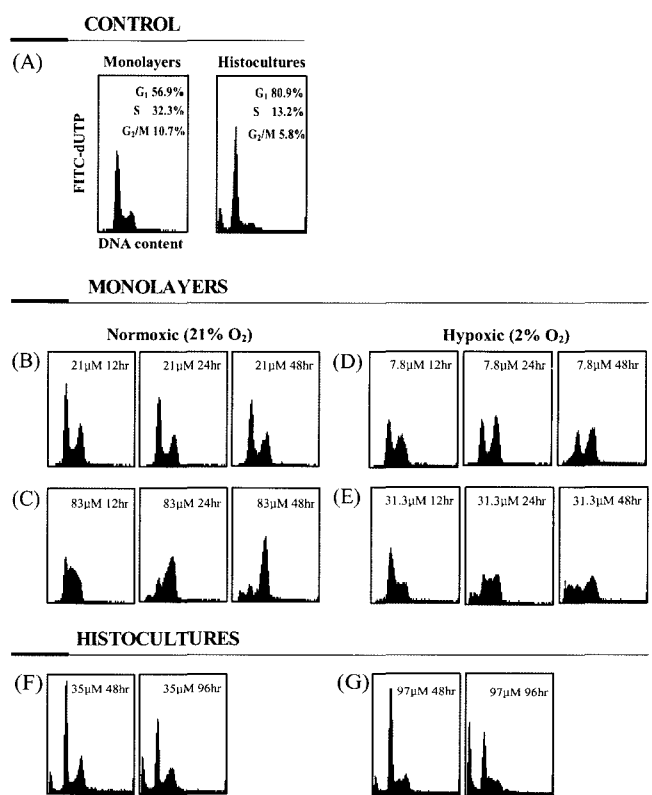


Figure 2—Representative DNA histograms showing cell cycle arrest effect induced by tirapazamine in A549 cells grown as monolayers under normoxic (21% O₂) condition (B, C), or hypoxic (2% O₂) condition (D, E), and as histocultures (F, G). DNA histograms were obtained at 12, 24, and 48 hr post-treatment in monolayers and at 48 and 96 hr in histocultures.

더불어 S세포주기 억제효과가 관찰되었다.

이와 더불어 티라파자민 투여 24시간 이후에는 hypodiploid세포의 출현이 현저하게 증가됨을 관찰하였다(Figure 2D와 2E). 이는 저산소농도조건에서의 티라파자민의 활성 증가에 의해 세포주기억제효과 및 세포자연사 유도효과가 증

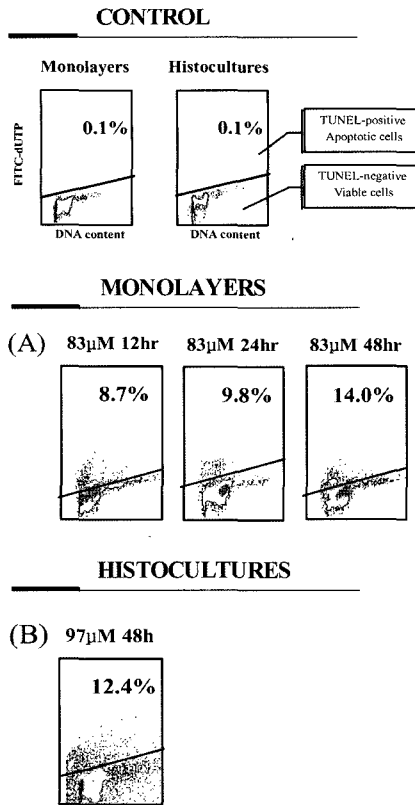


Figure 3—Simultaneous analysis of cell cycle arrest and apoptosis induced by tirapazamine in A549 cells grown in monolayers (A) and histocultures (B). Multi-color density plots were constructed after bivariate analysis on DNA histograms obtained with FITC-dUTP (TUNEL labeling intensity) and PI (DNA content) double-stained samples. The density levels are calculated as a percentage of the total event number. The density levels are not based on the maximum number of events. The lowest level represents 10% of the total number of events, the next level represents 30%, then 50, 70, and 90%.

진됨을 보여주는 것이다. 티라파자민에 의해 TUNEL양성으로 나타나는 apoptotic세포는 IC₈₀농도인 83.0 µM에서 12시간 처리 후 8.7%, 48시간 처리 후 14.0%로 관찰되었으며, 이러한 apoptotic세포들이 G₁ 및 S기의 세포들에서 세포자멸사가 유도되는 것으로 관찰되었다(Figure 3A).

이식절편의 조직배양계에서는 IC₅₀과 IC₈₀수준의 농도로 처리 후 각각 48시간과 96시간에서의 세포주기분포억제 효과를 관찰하였다. IC₅₀수준의 35.0 µM 농도에서는 48시간부터 대조군과 비교 시 현저한 G₂/M 세포주기억제효과가 관찰되었으며, IC₈₀ 농도인 97.0 µM에서는 S세포주기 억제효과도 함께 관찰되었다(Figure 2F와 2G). 이는 약물에 의한 세포주기억제효과가 배양계의 차이에 크게 영향 받지 않음을 시사한다. 한편 이식절편의 조직배양계에서 티라파자민에 의해 유도된 apoptotic세포들은 G₁주기의 세포와 유사한 DNA함량을 보였으며 이에 따라 조직배양계에서도 단층세포

배양계에서와 마찬가지로 G₁세포주기에서 세포자멸사가 유도되는 것으로 보인다(Figure 3B).

고 찰

본 연구에서는 단층세포배양계와 이식절편의 조직배양(histocultures)에서 티라파자민의 항암효과의 항증식효과를 비교하였다. 전통적인 *in vitro* 실험계인 단층세포배양계와 비교하여 삼차원배양계에서는 세포의 항상성(cell homeostasis)과 암세포의 거동이 인체 내 조건에 근접하게 재현되는 것으로 알려져 있다.^{3,4,17} 본 실험에서는 인체비소세포폐암 세포의 이종이식(xenograft)절편의 조직배양계를 실험모델로서 사용하였다. 본 연구팀은 이전연구에서 조직배양의 성장추이와 조직학적 검사를 통해 항암제의 약물약력연구 실험계로서의 적합성을 확인하였다.¹⁸ 삼차원배양계인 조직배양계에서 암세포의 성장은 단층세포배양계와 현저한 차이(성장율의 감소, G₁ 세포주기의 증가)를 나타내었다. 이러한 성장특성은 약물에 대한 감수성 및 반응기전의 차이로 나타날 수 있으며, 이러한 점에서 조직배양계를 이용하여 얻는 약물약력 및 그 기전 정보의 임상적 의미가 크다.

티라파자민의 항증식활성은 삼차원배양계인 조직배양절편에서 감소되는 경향을 보였으나(48시간까지 약 2배의 IC₅₀ 차이, Table I), 약물노출 시간을 96시간까지 증가시킴으로써 거의 동일한 수준의 활성이 관찰되었다. 또한 12시간의 비교적 짧은 약물처리시간에도 불구하고 내성을 보이는 저항분율은 관찰되지 않았다(결과 미제시). 이는 파크리타셀의 경우와 대조되는 점인데 파크리타셀의 경우 조직배양계에서의 세포독성은 단층세포배양계와 비교 시 현저히 낮았다. 약물의 투여농도가 단층세포배양계보다 높음에도 불구하고(14 nM ~35,000 nM) 약물투여 시간의 모든 조건에서 단층세포배양계보다 높은 저항분율이 관찰되었다(즉, 24, 48 및 96시간에 각각 67, 58 및 51%).¹⁸

티라파자민은 저산소환경에서 더욱 세포독성이 향상되는 bioreductive항암제의 일종이다.^{19,20} 정상조직보다 암조직에서 보다 더 낮은 산소분압이 보고되면서 이러한 약제 개발의 이론적 밑바탕이 되었으며, 산소농도가 낮은 소위 hypoxic tumor는 방사선 치료와 세포독성항암제에의 내성문제로 인식되었기 때문에²¹ 유용성에 대한 기대가 커지고 있다. 낮은 산소농도 환경에서 티라파자민은 one-electron reduction에 의해 활성화 물질로 전환되며 이는 DNA손상으로 세포독성을 유발시킨다.²² 본 연구에서 티라파자민의 이러한 저산소분압 선택성을 알아보기 위해 저산소환경(2% O₂)과 정상산소분압(21% O₂)에서 항증식활성을 비교하여 보았다. HCR

값은 약물노출시간의 증가에 의해 4배까지 증가되었으며 (Table I), 이는 혈액내 혹은 암조직 주위의 약물농도를 장시간 유지시킴으로써 암세포에 대한 선택적 독성을 향상시킬 수 있음을 시사한다. 비혈관조직의 산소투과는 0.25 mm인 것으로 보고되었으며,²³⁾ 본 실험에서 조직배양 암조직절편의 직경이 약 1 mm이다. 따라서 본 실험에서 배양된 조직절편 내에는 산소분압의 차이가 존재했을 것으로 생각되며 산소분압 조건이 다양한 세포집단(cell population)으로 구성되어 있음을 추측할 수 있다. 이러한 저산소분압의 존재를 고려한다면 티라파자민의 항증식활성이 조직배양계에서 정상산소분압 조건하의 단층세포배양계에서보다 향상되어야 하지만 유사한 수준의 IC₅₀값이 관찰되었다. 이러한 현상은 티라파자민의 암조직절편내 침투가 제한적 일 것이라는 추측을 가능하게 한다. 약물침투제한이 없는 단층세포배양계를 이용하여 저산소분압하에 노출시킨 경우에 항증식활성은 매우 높아졌다(Table I). 이전의 다른 연구들이 저산소분압에서 500 배 이상의 세포독성 증가를 예측하였는데¹⁰⁾ 이는 약물침투 제한을 고려하지 않은 부정확한 예측이었다. 또 다른 삼차원 배양계인 다세포구상체를 이용한 연구에서도 본 연구와 유사한 결론이 보고된 바 있는데^{19,24)} 이 결과들은 티라파자민이 세포층 투과 시 수반되는 대사에 의해 조직내부세포에 유효약물농도가 낮아지고 세포독성효과가 크게 저하됨을 보여주었다. 아울러 이러한 세포독성효과와 저하가 침투장벽 등의 삼차원적 구조특성뿐 아니라 약물의 감수성 및 내성에 관련된 신호전달체계의 차이에 의해 유발되었을 가능성이 있으므로 이에 관한 연구가 수행되어야 할 것이다.

티라파자민이 세포주기 저해를 유발한다는 보고는 있었으나,²⁵⁾ 세포독성효과에 세포주기 저해가 미치는 영향에 대한 충분한 검토는 아직까지 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 단층세포배양계(정상산소분압과 저산소분압) 및 조직배양에서 티라파자민의 처리에 의한 세포주기저해효과를 살펴보았다. 티라파자민은 세포주기 진행을 억제하여 G₂/M 정체를 유도하지만 세포자연사는 G₂/M 주기가 아닌 G₁주기에서 유도됨을 보여주었다(Figure 2와 3). 이는 티라파자민에 의한 세포주기저해효과와 세포자연사유도 효과의 기전이 다를 가능성을 암시해 주며 G₁ 정체를 유발하는 약물과 약효상승효과(synergism)를 보일 가능성이 있고 이를 확인하는 연구가 필요할 것이다.

결 론

결론적으로 본 실험의 결과는 단층 및 삼차원세포배양계에서 티라파자민의 노출시간 연장에 의해 항증식효과와 항

상을 기대할 수 있으며 저산소분압세포에 대한 선택적 세포독성의 향상 또한 기대할 수 있는 것을 보여주었다. 다른 항암제들과는 달리 저산소분압 특이적 활성으로 인해 삼차원 배양된 암세포에서 노출시간 연장만으로도 항증식활성을 의미 있게 증가시킬 수 있다는 것 또한 보여주었다. 세포주기 저해 효과 및 세포자연사도 약물농도 증가 및 저산소분압환경에서 향상됨을 관찰하였다. 따라서 티라파자민은 인체 고형암에 대해 선택적인 활성을 보일 수 있는 항암제로 판단되며, 약물전달시스템을 이용하거나 혈관신생억제제와의 병용 등을 통해 약물노출을 연장시킴으로써 항암효능을 개선할 수 있다고 사료되었다.

감사의 말씀

본 연구논문은 과학기술부(M10414030001-05N1403-00111) 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) H. Jaeschke, Cellular adhesion molecules: Regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases, *Am. J. Physiol.*, **273**, G602-11 (1997).
- 2) P.A.J. Henricks and F.P. Nijkamp, Pharmacological modulation of cell adhesion molecules, *Eur. J. Pharmacol.*, **344**(1), 1-13 (1998).
- 3) W. Mueller-Klieser, Tumor biology and experimental therapeutics, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**(2-3), 123-39 (2000).
- 4) R.M. Sutherland, Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model, *Science*, **240**(4849), 177-84 (1988).
- 5) R.A. Vescio, C.H. Redfern, T.J. Nelson, S. Ugoretz, P.H. Stern and R.M. Hoffman, In vivo-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional gel-supported primary culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**(14), 5029-33 (1987).
- 6) R.M. Hoffman, In vitro sensitivity assay in cancer: A review, analysis and prognosis, *J. Clin. Lab. Anal.*, **5**(2), 133-43 (1991).
- 7) R.M. Hoffman, In vitro assays for chemotherapy sensitivity, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **15**(2), 99-111 (1993).
- 8) B. Singh, R. Li, L. Xu, A. Poluri, S. Patel, A.R. Shaha, D. Pfister, E. Sherman, A. Goberdhan, R.M. Hoffman and J. Shah, Prediction of survival in patients with head and neck cancer using the histoculture drug response assay, *Head Neck*, **24**(5), 437-42 (2002).
- 9) S. Suda, S. Akiyama, H. Sekiguchi, Y. Kasai, K. Ito and A. Nakao, Evaluation of the histoculture drug response assay as a sensitivity test for anticancer agents, *Surg. Today*, **32**(6), 477-81 (2002).

- 10) J.M. Brown and A.J. Giaccia, Tumor hypoxia: the picture has changed in the 1990s, *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**(1), 95-102 (1994).
- 11) L.D. Skarsgard, M.W. Skwarchuk, A. Vinczan and D.J. Chaplin, The effect of pH on the aerobic and hypoxic cytotoxicity of SR4233 in HT-29 cells, *Br. J. Cancer*, **68**(4), 681-3 (1993).
- 12) K.B. Peters and J.M. Brown, Tirapazamine: A hypoxia-activated topoisomerase II poison, *Cancer Res.*, **62**(18), 5248-53 (2002).
- 13) J.E. Evans, K. Yudoh, Y.M. Delahoussaye and J.M. Brown, Tirapazamine is metabolized to its DNA damaging radical by intranuclear enzymes, *Cancer Res.*, **58**(10), 2098-101 (1998).
- 14) J.L. Au, D. Li, Y. Gan, X. Gao, A.L. Johnson, J. Johnston, N.J. Millenbaugh, S.H. Jang, H.J. Kuh, C.T. Chen and M.G. Wientjes, Pharmacodynamics of immediate and delayed effects of paclitaxel: Role of slow apoptosis and intracellular drug retention, *Cancer Res.*, **58**(10), 2141-8 (1998).
- 15) T. Furukawa, T. Kubota and R.M. Hoffman, Clinical applications of the histoculture drug response assay, *Clin. Cancer Res.*, **1**(3), 305-11 (1995).
- 16) J.E. Kalns, N.J. Millenbaugh, M.G. Wientjes and J.L. Au, Design and analysis of *in vitro* antitumor pharmacodynamic studies, *Cancer Res.*, **55**(22), 5315-22 (1995).
- 17) O. Oudar, Spheroid: Relation between tumour and endothelial cells, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**(2-3), 99-106 (2000).
- 18) J.-K. Park, S.-Y. Kim and H.-J. Kuh, Pharmacodynamics of antitumor activity of paclitaxel in monolayers and histocultures of human NSCLC cells, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**, 361-367 (2005).
- 19) E.M. Zeman, J.M. Brown and M.J. Lemmon, SR4233: A new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic cells, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **12**(7), 1239-42 (1986).
- 20) J.M. Brown, SR4233 (tirapazamine): A new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumors, *Br. J. Cancer*, **67**(6), 1163-70 (1993).
- 21) M. Hockel, K. Schlenger, M. Mitze, U. Schaffer and P. Vaupel, Hypoxia and radiation response in human tumors, *Semin. Radiat. Oncol.*, **6**(1), 3-9 (1996).
- 22) U. Emmenegger, G.C. Morton, G. Francia, Y. Shaked, M. Franco, A. Weinerman, S. Man and R.S. Kerbel, Low-dose metronomic daily cyclophosphamide and weekly tirapazamine: A well-tolerated combination regimen with enhanced efficacy that exploits tumor hypoxia, *Cancer Res.*, **66**(3), 1664-74 (2006).
- 23) I.R. Freshney, Culture of animal cells, New York: Alan R. Liss, Inc. 297 (1987).
- 24) R.E. Durand and P.L. Olive, Evaluation of bioreductive drugs in multicellular spheroids, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **22**(4), 689-92 (1992).
- 25) P.S. Lin, K.C. Ho and S.J. Yang, Tirapazamine (SR4233) interrupts cell cycle progression and induces apoptosis, *Cancer Letter*, **105**(2), 249-55 (1996).