

위암 세포주에서 HERCEPTIN 과
항암제 병용요법시
HER-2/*neu* (erbB-2)의
발현정도와 상승효과의 상관관계

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 정 범

위암세포주에서 HERCEPTIN 과
항암제 병용요법시
HER-2/*neu*(erbB-2)의
발현정도와 상승효과의 상관관계

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 정 범

위암세포주에서 HERCEPTIN 과
항암제 병용요법시
HER-2/*neu* (erbB-2)의
발현정도와 상승효과의 상관관계

지도교수 정 현 철

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 정 범

김정범의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

때는 2000년 가을, 태풍이 한국 전역을 강타하여 비가 억수로 내리는 날 오전 11시, 장소는 암센터 6층 암연구소, 옆에서는 말없이 담배를 마구 피우고 계시던 유내춘 선생님, 앞에는 정현철, 김태수, 박규현 선생님께서 앉아 계시고 또다른 옆에는 라선영 선생님이 앉아계셨습니다.

여기 온지 엇그제 같은데 벌써 3년이라는 시간이 흘러 여기까지 왔습니다. 졸업논문을 준비하느라 밤낮을 새며 연구소에서 실험을 할 때만 하더라도 과연 논문을 쓰고 졸업을 할 수 있을까 아득했지만 한 과정, 한 과정을 거치면서 부족한 점도 많이 깨닫고 연구가 무엇인지 많이 배울 수 있는 소중한 시간이었습니다. 이런 어려운 과정을 무사히 마치고 감사의 글을 쓰면 논문을 마감하면서 여러 고마운 분들께 감사하는 마음을 전하고자 합니다 .

이 작은 논문이 나오기 까지 여러 사람의 도움이 있었습니다. 지난 2년 동안의 우리 암전이연구센터 생활을 통해 무척 많은 것을 외적, 내적으로 배울 수 있었고 편협한 실험적사고에서 조금이나마 벗어날 수 있었던 것은 정현철 선생님의 매서운 질책이 있었기에 가능했습니다. 정현철 선생님! 대학원생활에 아낌없이 도움을 주시고 부족한 점이 많았지만 때론 질책으로 때론 따뜻하게 다독겨주시며 대학원 생활을 무사히 마치게 도와주셔서 고맙습니다. 바쁘신 중에서도 논문에 조언을 아끼지 않으신 라선영 선생님과 많은 관심을 가져주신 김태수, 박규현, 양상화 선생님께 감사를 드립니다.

대학원에 들어온 첫 학기부터 오랜 동안 실험실 생활을 함께 하며 정을 쌓아온 우영이, 유근이 그리고 항상 저에게 칭찬과 조언을 아끼지 않았던 생각이 깊으신 심웅호 선생님, 선배 태희 형님과 후배 강파에게도 여러모로 도와줘서 모든 어려움 속에서도 항상 든든한 버팀목이 되어 여기까지 오게 되어 고맙다는 말을 전합니다. 그리고 감사의 글에 이름이 없다고 섭섭해하고 있을 당신이 있었기에 지금의 제가 존재함을 감사합니다.

생물을 공부하는 이들에게는 더욱 힘들기만한 이땅의 현실을 더욱 힘차게 헤쳐나가시리라 믿습니다. 그러나 이 논문은 고향에 계신 아버님, 어머님, 그리고 형님과 누님의 결정적인 헌신이 있었기에 가능했습니다. 이제는 이 분들에게도 도움이 되는 인간으로 살기 위해 더욱 분발하리라는 소박한 다짐으로 미안한 마음을 대신하려합니다. 마지막으로 마음 속 깊이 언제나 어깨를 함께하며 격려해준 동선, 근영에게 고마운 마음을 전합니다.

모든이의 행복을 바라며 초심을 지키려고 노력하는
김 정 범 올림

목 차

국문요약.....	1
I. 서론.....	4
II. 대상 및 방법.....	7
1) 연구 재료.....	7
(1) 대상 세포주 및 배양.....	7
(2) 사용 약제.....	7
2) HER-2/neu 단백질의 발현 조사.....	8
3) 위암세포주에서의 Herceptin [®] 및 항암제에 대한 생체 외(<i>in vitro</i>) 약제감수성 검사.....	9
4) 병용요법후 CI value 계산.....	11
III. 결과.....	13
1) HER-2/neu 단백질의 발현정도를 FACS로 측정.....	13

2) 위암세포주에서의 Herceptin [®] 및 항암제에 대한 생체 외 약	
제감수성 검사.....	13
(1) 단일 약제 사용시의 생체 외 약제감수성 검사	
.....	13
(2) Herceptin [®] 및 항암제 복합 사용시의 생체 외 약제감수	
성 검사.....	14
IV. 고찰.....	28
V. 결론.....	34
참고문헌.....	36
영문요약.....	42

표 차례

Table 1. IC ₃₀ and IC ₅₀ of five anti-cancer agents against YCC-2, YCC-3, NCI-N87, U-87 MG and SK-BR-3.....	15
Table 2. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin [®] and Doxorubicin in gastric cancer cell lines.....	16
Table 3. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin [®] and Cisplatin in gastric cancer cell lines.....	17

Table 4. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin[®] and Paclitaxel in gastric cancer cell lines.....18

Table 5. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin[®] and 5-FU in gastric cancer cell lines.....19

그림 차례

Fig. 1. HER-2/ <i>neu</i> expression in gastric cancer cell lines by FACS.	20
Fig. 2. Chemosensitivity of Herceptin [®] in gastric cancer cell lines.....	21
Fig. 3. Chemosensitivity of doxorubicin in gastric cancer cell lines.....	22
Fig. 4. Chemosensitivity of cisplatin in gastric cancer cell lines.....	23
Fig. 5. Chemosensitivity of paclitaxel in gastric cancer cell lines.....	24
Fig. 6. Chemosensitivity of 5-FU in gastric cancer cell	

lines.....25

Fig. 7. Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin[®] and ① doxorubicin, ② cisplatin in gastric cancer cell lines.....27

국문요약

위암세포주에서 HERCEPTIN®과 항암제 병용요법시 HER-2/*neu* (erbB-2)의 발현정도와 상승효과의 상관관계

위암은 우리나라에서 가장 흔한 암이지만 치료에 많은 제한을 갖는 암종이다. 다양한 암종에서 과발현되며 불량한 예후와 관련이 있다고 알려진 인간의 HER-2/*neu* 암유전자 및 그 단백질은 위암에서도 예후와 관련성이 있음이 보고되고 있다. HER-2/*neu* 특히 유방암 환자의 약 30% 에서 과발현되며 에스트로젠 수용체의 기능을 하향조절하고, 암의 증식을 유도하여 항암치료에 저항성을 유발시킨다. 전이성 유방암에서는 이 단백질의 기능을 차단하는 재조합 인간형 항-HER-2/*neu* 항체 (recombinant humanized anti-HER2 antibody: Herceptin®)를 투여함으로써, 병용투여한 항암제의 세포독성을 증가시켜 치료반응율을 증가시킨다. 이에 본 연구에서는 ① 유세포 분석 (FACS)을 시행하여 위암 세포주에서 HER-2/*neu* 단백질의 발현을 조사하고 ② HER-2/*neu* 단백질의 발현에 따른

Herceptin[®] 및 doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, 5-FU 등의 항암제의 단독 혹은 병용투여 후의 약제감수성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 3가지 위암 세포주 (YCC-2, YCC-3, NCI-N87)에 대해 HER-2/*neu* 단백 발현양상을 유세포계측기 (FACS)로 조사하여 NCI-N87은 강양성 세포주(88%)로, YCC-2는 중양성 세포주(55%)로, YCC-3는 약양성 세포주(48%)로 정하였다. 양성대조세포로 유방암 세포주인 SK-BR-3 (89%), 음성대조세포로 U-87 MG (6%) 뇌종양 세포주를 이용하였다.

2. 단일 약제에 의한 생체 외 약제감수성 검사에서 HER-2/*neu* 단백발현 양성대조세포주인 SK-BR-3 세포주는 Herceptin[®]에 의해 농도의존적으로 세포성장 억제가 나타났다. HER-2/*neu* 단백발현 음성판정 기준세포주 U-87 MG는 Herceptin[®]의 농도의 증가에도 불구하고 세포성장 억제가 관찰되지 않았다. 위암세포주는 Herceptin[®] 단독투여에 의해 효과적인 세포성장 억제가 유발되지 않았으며, 4가지 항암제 (doxorubicin, cisplatin, paclitaxel 및 5-FU) 에 대해서는 모두 농도의존적으로 세포성장이 억제되었다.

3. Herceptin[®]과 항암제를 병용 사용하여 병용지수 (CI ; combination index) 산출에 의한 약제 감수성비교시에 Herceptin[®]과 doxorubicin의 병용요법은 모든 세포주에서 상승효과를 나타냈고 Herceptin[®]과 cisplatin의 병용요법에서는 NCI-N87과 SK-BR-3에서, Herceptin[®]과 paclitaxel의 병용투여에서는 YCC-2에서 상승효과를 나타내었다. Herceptin[®]과 5-FU의 병용투여에서 모든 세포주가 길항효과를 나타내었다.

이상과 같은 결과로 많은 위암 세포주에서 HER-2/*neu* 단백질발현 정도에 따라 Herceptin[®]과 병용하는 항암제의 효능이 다르게 나타났다. 따라서 위암에서 Herceptin[®]를 투여시에는 HER-2/*neu*의 발현정도가 병용약제 선택의 기준으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말 : HER-2/*neu* (erbB-2), HERCEPTIN[®], 위암, 병용요법, CI.

위암세포주에서 HERCEPTIN®과 항암제 병용요법시
HER-2/*neu* (erbB-2)의 발현정도와
상승효과의 상관관계

<지도교수 정현철>

연세대학교 대학원 의과학과

김 정 범

I. 서론

성장인자 및 그 수용체에 의한 신호전달체계가 발암과정에 중요한 역할을 함이 알려진 이후 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 이 중 대표적인 예가 세포막 당단백인 HER-2/*neu*(erbB-2) 단백질으로, 이 단백질은 tyrosine kinase¹ 활성을 가지는 성장인자 수용체이다. 정상세포도 HER-2/*neu*에 연관된 단백을 분비하지만,

정상적인 세포조절이 파괴되면 다량의 단백을 발현하는 과발현 (overexpression)상태가 되어 세포분열과 세포성장 속도를 증가시켜 암성변화를 유발한다². HER-2/*neu* 유전자는 사람의 17q21번 염색체에 존재하며³ 표피성장인자 수용체 (epidermal growth factor receptor)와 유사한 배열을 가지는 단백질에 대한 유전정보를 가지고 있다^{4,5}. 그 중 EGF (epidermal growth factor) receptor family는 수용체 tyrosine kinase 활성을 가지는 EGF receptor, c-erbB-2, c-erbB-3, c-erbB-4^{6,7,8}로 구성 되어있다. HER-2/*neu* 종양단백은 종양세포의 성장과 분화에 관여하는 수용체로 p185kD의 세포막당단백이며 유방암, 난소암, 위암^{9,10,11,12} 등에서 25~30% 정도 과발현되며 이런 환자의 예후는 불량하다^{13,14,15}.

유방암에서는 HER-2/*neu* 유전자 증폭과^{16,17,18} HER-2/*neu* 단백질과발현이 환자의 예후나 치료반응에 관련이 있다는 많은 보고들과 함께, 유방암에서 발견되는 정도의 HER-2/*neu* 과발현이 NIH/3T3 세포주의 악성변이를 유발하는데 충분함이 밝혀졌다¹⁹. 즉 유방암의 발생과 진행 또는 악성도에 HER-2/*neu*가 관여한다는 사실을 알 수 있으며, HER-2/*neu* 과발현이 임과절 전이가 있는 환자에서는 호르몬수용체의 존재 유무보다 더 가치 있는 예후인자라 보고 되고 있다⁹. 따라서 이러한 HER-2/*neu* 단백을 치료표적으로 하는 약제인 재조합 인간형 항-HER-2/*neu* 항체 (recombinant

humanized anti-HER2 antibody: Herceptin®)의 효과가 유방암치료에서 보고되고 있다²⁰.

위암은 우리나라 성인 남녀에서 가장 발생빈도가 높은 암으로 위암의 발생과정은 다양한 유전적 변이를 동반하는 다단계 발암과정으로 이해되고 있다. HER-2/*neu* 유전자 및 그 단백질 발현과 위암 발생과정의 연관성이 보고되었고²¹, HER-2/*neu* 단백질 발현이 위암의 불량한 예후인자로 보고되었다²². Herceptin®은 cytostatic agent로 단독치료로는 효율적인 항암효과를 기대 할 수 없으며 타항암제나 생물학제와의 병용요법에 대해 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 위암 세포주에서 Herceptin®과 항암제와 병용요법시 병용효능에 대해서는 아직 정확하게 연구된 결과가 없다¹³. 또한 HER-2/*neu* 발현정도와 병용요법 효과와 상관성 연구는 완전하게 규명되지는 않았다. 따라서 본 연구에서는 HER-2/*neu* 종양단백을 목표로 하는 Herceptin® (Trastuzumab, Genentech Inc., CA, USA)^{23,24,25}을 위암에 투여시 HER-2/*neu*의 발현정도에 따라서 효과적인 항암제와의 조합을 조사하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

1) 대상 세포주 및 배양

위암 세포주는 연세대학교 의과대학 암연구소에서 복강 내 전이 위암으로부터 수립한 YCC-2, YCC-3 세포주 및 미국의 NCI (National Cancer Institute, CRL5822, USA)에서 수립한 NCI-N 87 세포주를 사용하였고, U-87 MG (ATCC, HTB14) 뇌종양 세포주와 SK-BR-3 (ATCC, HTB30) 유방암 세포주를 각각 HER-2/*neu* 단백발현의 양성 및 음성대조세포군으로 사용하였다. 이들 세포주는 56℃에서 30분간 비활성화된 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)과 penicillin 100unit/ml, streptomycin 0.1mg/ml이 함유된 세포배양용 배지 (MEM, minimum essential media, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 5% CO₂ 의 존재하에 37℃ 항온항습 배양기에서 배양하였다.

2) 사용약제

제조합 인간형 항-HER-2/*neu* 항체인 Herceptin[®] (Trastuzumab, 440 mg/20ml, 주사제, Genentech Inc., South San Francisco, CA) 과 위암에서 효과가 인정되는 항암제인 adriamycin[®] (Doxorubicin, 10 mg/5ml, 주사제, 일동제약, 서울), cisplatin[®] (Cisplatin, 10 mg/vial, 주사제, 일동제약, 서울), taxol[®] (Paclitaxel, 30 mg/vial, 주사제, 한국 BMS, 서울) 및 5-FU[®] (5-fluorouracil, 250 mg/5ml, 주사제, 중외제약, 서울)를 선택하여 매 실험 시마다 약제를 세포배양액에 희석하여 사용하였다.

2. HER-2/*neu* 단백질발현 조사

HER-2/*neu* 단백질발현조사는 Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS, Becton Dickinson, U.S.A.)를 이용한 세포표면 단백질염색 (Immunophenotyping)을 시행하였다. 일차항체는 사람의 HER-2/*neu* 단백질에 대한 생쥐 (mouse) 단일클론항체 (monoclonal antibody, LAB VISION, CA)를 사용하였다. 배양된 세포주를 trypsin-EDTA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)로 처리하여 세포를 얻은 후 각각의 세포주 1 X 10⁶ 개에 단일클론항체 1:200 희석액을 50 μ l 점적하고 4°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후에 2% FBS 인산완충용액 (PBS: phosphate-buffer solution, pH 7.6 Ca⁺⁺

Mg⁺⁺ free, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)에 2회 세척 후 2차 항체 (Anti-Mouse FITC-Conjugated antibody, Novocastra, USA) 1:40 희석액을 50 μ l 점적하고 다시 4°C에서 40분 반응시켰다. 2차 항체반응이 끝난 후 인산완충용액에서 2회 세척한 후 40 μ m의 nylon mesh로 filtration 하여 단일 세포부유물을 얻어 FACS에서 분석하였다.

3. 위암 세포주에서의 Herceptin[®] 및 항암제에 대한 생체 외 (*in vitro*) 약제감수성 검사

위암 세포주의 생체 외 약제 감수성 검사는 3-(4,5-dimethyl-2-tetrazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) 검사를 이용하였다. 이는 살아있는 세포에서는 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 용해성의 tetrazolium염이 불용성의 formazan 침전물로 전환이 되는 점을 이용하여 분광흡도계로 흡광도 (색소흡수율)를 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 방법이다. 방법을 약술하면, 세포성장 곡선상 지수성장기에 해당하는 위암 세포주 1×10^4 개씩을 180 μ l의 배양액에 부유하여 96 well plate의 well에 각각 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 단일약제에 대한 약제감수성 검사를 위하여 ①

Herceptin[®] (4.625, 9.25, 18.5 37 uM), doxorubicin (0.0183, 0.183, 1.83, 18.3 uM), cisplatin (0.166, 1.666, 16.66, 166.6 uM), paclitaxel (0.0585, 0.585, 5.85, 58.5 uM) and 5-FU (38.43, 384.37, 3843.78, 38437.8 uM)를 농도별로 20 μ l 배지에 녹여 각각의 well에 투여하고 대조군의 well에는 약제대신 동량의 배지를 투여하여 96시간 배양하였다. ② 병용요법의 상승효과는 Herceptin[®]+Doxorubicin, Herceptin[®]+Cisplatin, Herceptin[®]+Paclitaxel 및 Herceptin[®]+5-FU의 조합으로 하였다. Herceptin[®]과 각 항암제 병용시 두 약제의 molar 농도를 일정비율로 고정하여 약제 감수성시험을 시행한 후, MTT를 2 mg/ml 농도로 인산완충액에 녹여 50 μ l씩 각 well에 첨가하여 4시간동안 추가 배양하였다. 상층액을 제거한 후, 150 μ l씩 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma, USA)를 각 well에 넣고 생성된 formazan 결정을 잘 용해시키기 위하여 약 15분간 가볍게 진탕하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석기인 Sunrise (Tecan, Hombrechtigon, Switzerland)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정한 후 대조군의 흡광도와 비교하여 다음과 같은 공식으로 세포독성능을 측정하였다. 약제의 각 용량별로 5 well을 3회 반복하여 MTT assay를 시행한 다음 평균을 구하여 결과를 분석하였다.

4. 병용요법후 CI value 계산

CI는 Chou-Talalay²⁶의 공식에 의해 구하였는데 이 값은 IC₅₀ (*Dm*)과 용량효능대비곡선 (the *m* value)으로부터 구하였다. Isobologram (CI = 1)의 고전적인 공식은 아래와 같이 하였다²⁷.

$$CI = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2$$

분모인 (*Dx*)₁ 과 (*Dx*)₂ 는 약제 D₁ (drug1)과 D₂ (drug2)를 단독으로 처리하였을 때의 %세포독성이고, 분자 (*D*)₁ 과 (*D*)₂ 은 약제 D₁ 과 D₂ 를 병용투여를 하였을 때의 %세포독성을 나타낸다.

$$Dx = Dm [fa/(1 - fa)]^{1m}$$

Dm 은 median-effect dose (IC₅₀)을 말하며 이것은 median-effect plot 의 X-intercept 의 antilog 로부터 아래의 공식에 의해 구한다.

$$X = \log (D) \text{ versus } Y = \log [fa/(1 - fa)]$$

m 은 median-effect plot 의 기울기이다. Multiple drug effect 분석은 Calcsyn (Biosoft, Cambridge, UK)을 사용하여 *m*, *Dm*, *Dx*, and *CI* values 을 계산하였다. (*Dx*)₁ 과 (*Dx*)₂ 는 Chou-Talalay 의 median-effect 공식으로부터 구할 수 있다. CI<1, CI=1,

CI>1 각각을 상승 (synergism), 유지 (summation), 길항 (antagonism)효과라고 정의하였다.

III. 결과

1) HER-2/*neu* 단백질 발현정도

3가지 위암 세포주 (YCC-2, YCC-3, NCI-N87)에 대해 HER-2/*neu* 단백질 발현을 조사하였다. YCC-3는 48% (약양성), YCC-2 위암 세포주는 55% (중양성), NCI-N87은 88% (강양성) 발현하였다. 양성 및 음성대조세포로 SK-BR-3 유방암 세포주는 89%, U-87 MG 뇌종양 세포주는 6% 발현하였다(Fig. 1).

2) 위암 세포주에서 Herceptin[®] 및 항암제에 대한 생체 외 약제감수성검사

(1) 단일 약제에 의한 생체 외 약제감수성 검사

Herceptin[®] 단독투여시 위암 세포주에서는 Herceptin[®]에 의한 경미한 세포성장 억제효과가 관찰되어 IC₅₀는 측정되지않았다(Fig. 2). 반면, 4가지 항암제 (doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, 5-FU)에 대해서는 농도의존적으로 세포성장 억제효과가 관찰되어 IC₅₀를 구하였다(Table 1, Fig. 3,4,5,6).

(2) Herceptin[®]과 항암제 병용투여시의 효과

Herceptin[®]과 doxorubicin를 병용투여 하였을 때 HER-2/*neu* 단백질발현 정도에 YCC-3(CI>1)를 제외한 세포주에서 상승효과(CI<1)가 관찰되었다(Table 2, Fig.7). Herceptin[®]과 cisplatin를 병용투여 하였을 때 SK-BR-3, NCI-N87 및 YCC-3에서 상승효과(CI<1)가 관찰되었으나 YCC-2, U-87 MG에서는 길항효과(CI>1)가 관찰되었다(Table 3, Fig. 7). Herceptin[®]과 paclitaxel를 병용투여 하였을 때 YCC-2, U-87 MG에서는 길항효과(CI>1)가 관찰되었고, YCC-3에서는 상승효과(CI<1), SK-BR-3, NCI-N87에서는 항암제의 용량에 따라 효과가 바뀌었다(Table 4, Fig. 7). Herceptin[®]과 5-FU를 병용투여 하였을 때는 모든 세포주에서 길항효과(CI>1)가 나타났다(Table 5, Fig. 8).

Table 1. IC₃₀ and IC₅₀ of five anti-cancer agents against YCC-2, YCC-3, NCI-N87, U-87 MG and SK-BR-3 cell lines

Anticancer agents	Cell lines (IC₃₀) μM				
	YCC-2	YCC-3	NCI-N87	SK-BR-3	U-87 MG
Herceptin	82.36	11.83	1326.72	0.0161	289.09
Doxorubicin	0.6	0.76	0.008	0.03	0.07
Cisplatin	1.79	21	9.28	14.54	2.58
Paclitaxel	0.52	6.45	0.86	0.19	0.3
5-FU	33.11	0.22	4.11	148.75	5.51

Anticancer agents	Cell lines (IC₅₀) μM				
	YCC-2	YCC-3	NCI-N87	SK-BR-3	U-87 MG
Doxorubicin	2.93	2.31	0.07	0.10	0.29
Cisplatin	4.51	30.73	45.86	5.65	20.63
Paclitaxel	1.24	9.61	1.49	0.42	0.79
5-FU	752.04	4.74	119.61	753.42	46.58

Table 2. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin® and Doxorubicin in gastric cancer cell lines.

A. YCC-2	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
DOX				2.93	0.54	0.98
HER				1201.02	0.32	0.91
DOX+HER	0.09	0.05	0.03	0.25	0.74	0.96
CI	synergy	synergy	synergy			
B. YCC-3	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
DOX				2.310	0.768	0.946
HER				46.063	0.623	0.970
DOX+HER	0.266	0.598	1.377	0.406	0.469	0.925
CI	synergy	synergy	antagonism			
C. NCI-N87	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
DOX				0.070	0.398	0.864
HER				113350	0.191	0.635
DOX+HER	0.005	0.004	0.003	0.000	0.437	0.995
CI	synergy	synergy	synergy			
D. U-87 MG	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
DOX				0.295	0.620	0.997
HER				1845.5	0.457	0.860
DOX+HER	0.441	0.435	0.448	0.101	0.589	0.992
CI	synergy	synergy	synergy			
E. SK-BR-3	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
DOX				0.103	0.832	0.998
HER				1424000	0.046	0.435
DOX+HER	0.046	0.074	0.117	0.005	0.616	0.985
CI	synergy	synergy	synergy			

DOX : Doxorubicin, HER : Herceptin, CI : Combination index

Table 3. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin® and Cisplatin in gastric cancer cell lines.

A. YCC-2	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
CDDP				4.512	0.921	0.882
HER				1201.0	0.316	0.915
CDDP+HER	1.375	2.707	5.337	2.232	0.587	0.965
CI	antagonism	antagonism	antagonism			
B. YCC-3	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
CDDP				30.733	2.227	0.929
HER				46.063	0.623	0.970
CDDP+HER	0.274	0.110	0.054	12.091	1.472	0.998
CI	synergy	synergy	synergy			
C. NCI-N87	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
CDDP				45.860	0.5306	0.929
HER				1.13E+05	0.1905	0.634
CDDP+HER	0.027	0.012	0.005	0.827	0.8759	0.956
CI	synergy	synergy	synergy			
D. U-87 MG	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
CDDP				5.651	1.084	0.984
HER				1845	0.457	0.859
CDDP+HER	9.176	9.853	10.579	2.561	1.013	0.991
CI	antagonism	antagonism	antagonism			
E. SK-BR-3	Combination Index Value			Parameter (단위:uM)		
Drug	ED50	ED75	ED90	Dm	m	r
CDDP				20.632	2.424	0.939
HER				1.42E+06	0.046	0.434
CDDP+HER	0.002	0.003	0.004	1.453	1.436	0.986
CI	synergy	synergy	synergy			

CDDP : Cisplatin, HER : Herceptin, CI : Combination index

Table 4. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin[®] and Paclitaxel in gastric cancer cell lines.

A. YCC-2		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
TAX				1.242	0.975	0.895	
HER				1201.02	0.316	0.914	
TAX+HER	6.029	14.774	36.205	0.850	0.543	0.816	
CI	antagonism	antagonism	antagonism				
B. YCC-3		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
TAX				9.609	2.129	0.940	
HER				46.063	0.623	0.970	
TAX+HER	0.225	0.172	0.185	7.010	1.220	0.889	
CI	synergy	synergy	synergy				
C. NCI-N87		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
TAX				1.49	1.56	0.96	
HER				113350	0.19	0.63	
TAX+HER	1747.94	0.807	0.0003	858.42	-0.16	0.90	
CI	antagonism	synergy	synergy				
D. U-87 MG		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
TAX				0.785	0.894	0.871	
HER				1845.53	0.457	0.859	
TAX+HER	361.023	1571.47	6840.35	1.265	0.407	0.889	
CI	antagonism	antagonism	antagonism				
E. SK-BR-3		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
TAX				0.421	1.112	0.964	
HER				1.42E+06	0.046	0.434	
TAX+HER	0.052	0.243	1.119	0.004	0.436	0.882	
CI	synergy	synergy	antagonism				

TAX : Paclitaxel, HER : Herceptin, CI : Combination index

Table 5. Calculated values for the Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin® and 5-FU in gastric cancer cell lines.

A. YCC-2		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
5-FU				4.739	0.279	0.920	
HER				46.063	0.623	0.970	
5-FU+HER	74054	2.89E+05	1.13E+06	71.077	0.207	0.928	
CI	antagonism	antagonism	antagonism				
B. YCC-3		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
5-FU				4.739	0.279	0.920	
HER				46.063	0.623	0.970	
5-FU+HER	74054	2.89E+05	1.13E+06	71.077	0.207	0.928	
CI	antagonism	antagonism	antagonism				
C. NCI-N87		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
5-FU				119.608	0.251	0.974	
HER				113350	0.191	0.635	
5-FU+HER	1.9E+17	3.2E+02	5.3E+29	3658800	-0.023	0.866	
CI	antagonism	antagonism	antagonism				
D. U-87 MG		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
5-FU				46.583	0.397	0.84124	
HER				1845	0.457	0.85991	
5-FU+HER	25540	4940.8	955.806	6.477	0.977	1	
CI	antagonism	antagonism	antagonism				
E. SK-BR-3		<i>Combination Index Value</i>			<i>Parameter (단위:uM)</i>		
<i>Drug</i>	<i>ED50</i>	<i>ED75</i>	<i>ED90</i>	<i>Dm</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	
5-FU				753.422	0.522	0.926	
HER				1424000	0.046	0.435	
5-FU+HER	226.516	173.362	132.681	488.149	0.598	0.935	
CI	antagonism	antagonism	antagonism				

HER : Herceptin, CI : Combination index

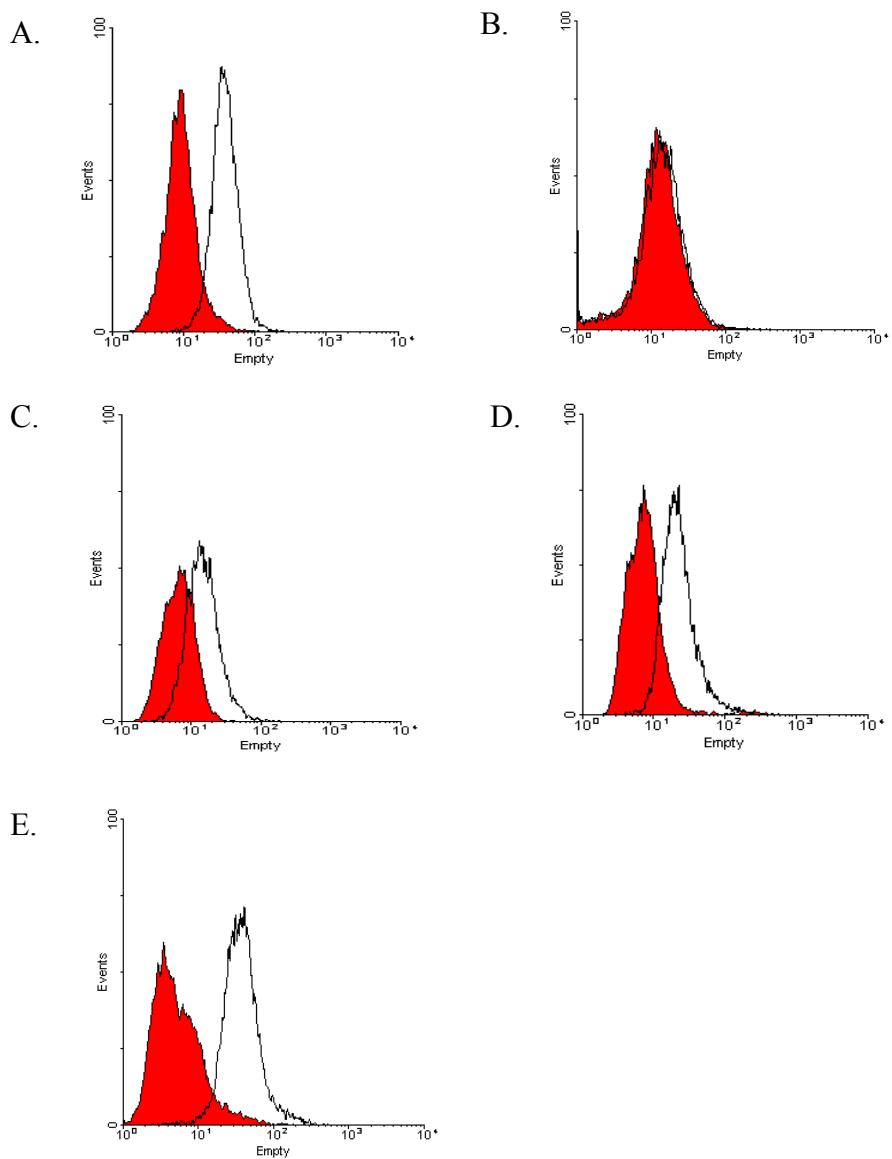


Fig. 1. HER-2/*neu* expression in gastric cancer cell lines by FACS.
A. SK-BR-3 (positive control); B. U-87 MG (negative control); C. YCC-3 (weak positive); D. YCC-2 (intermediate positive); E. NCI-N87 (strong positive)

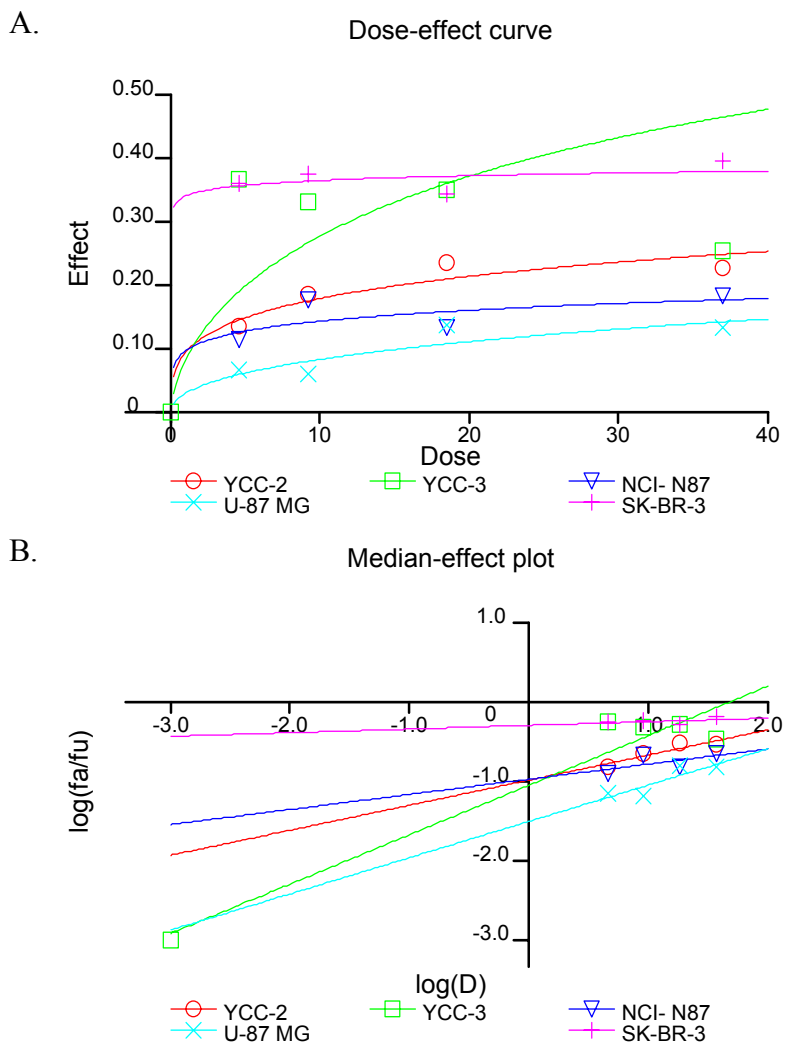


Fig. 2. Chemosensitivity of Herceptin® in gastric cancer cell lines.
A. Dose-effect curve; B. Median-effect curve

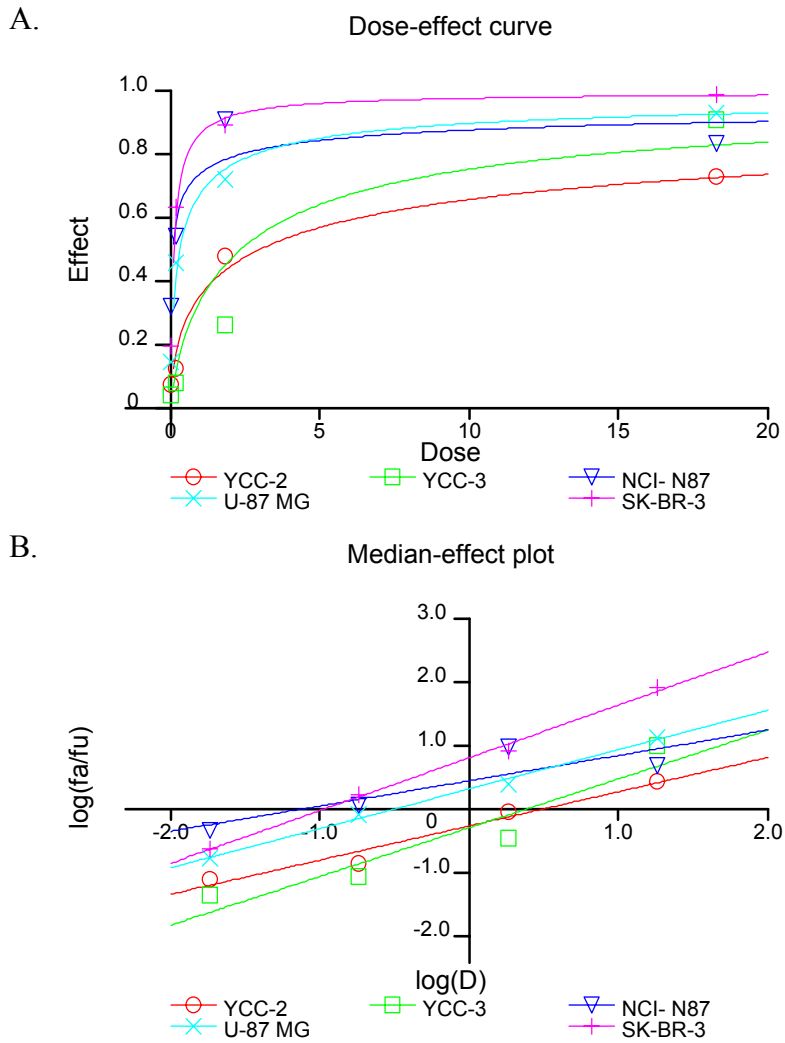


Fig. 3. Chemosensitivity of doxorubicin in gastric cancer cell lines.
A. Dose-effect curve; B. Median-effect curve

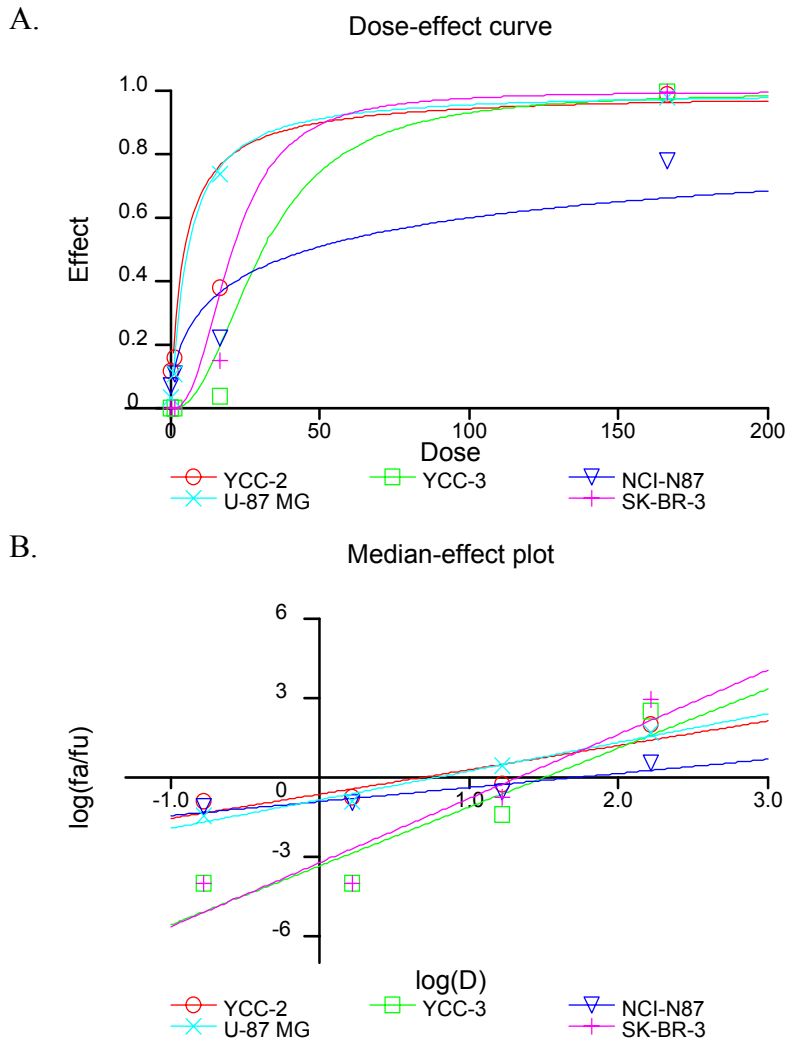


Fig. 4. Chemosensitivity of cisplatin in gastric cancer cell lines.
A. Dose-effect curve; B. Median-effect curve

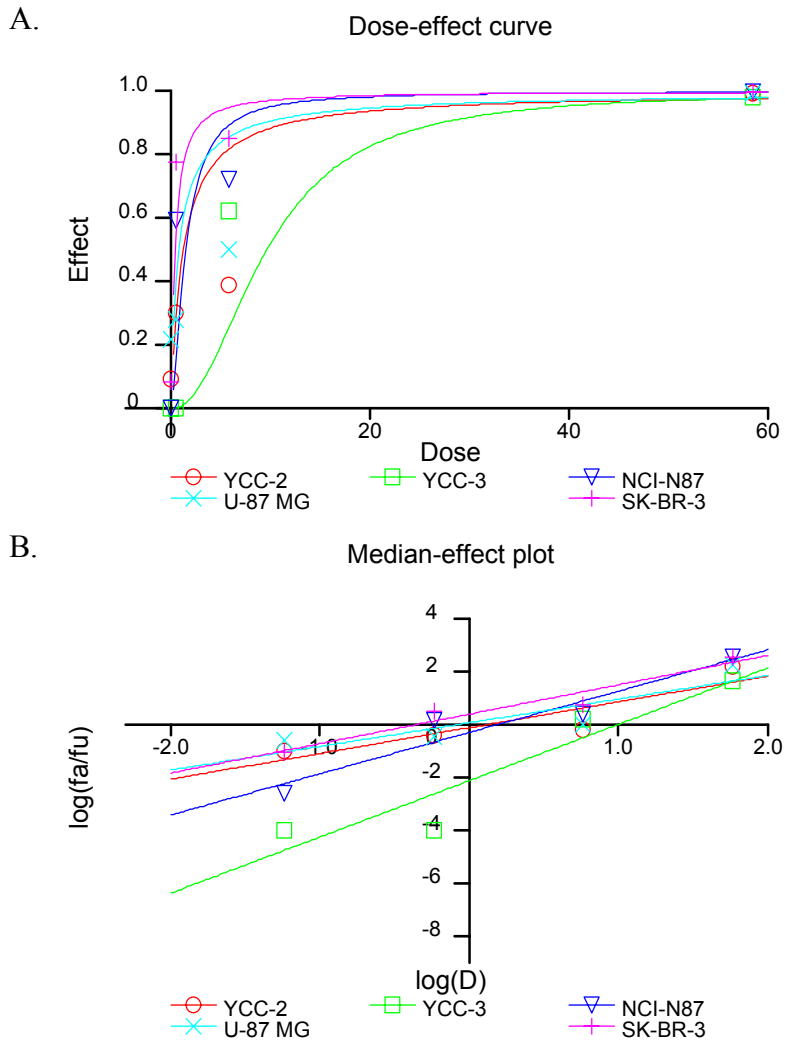
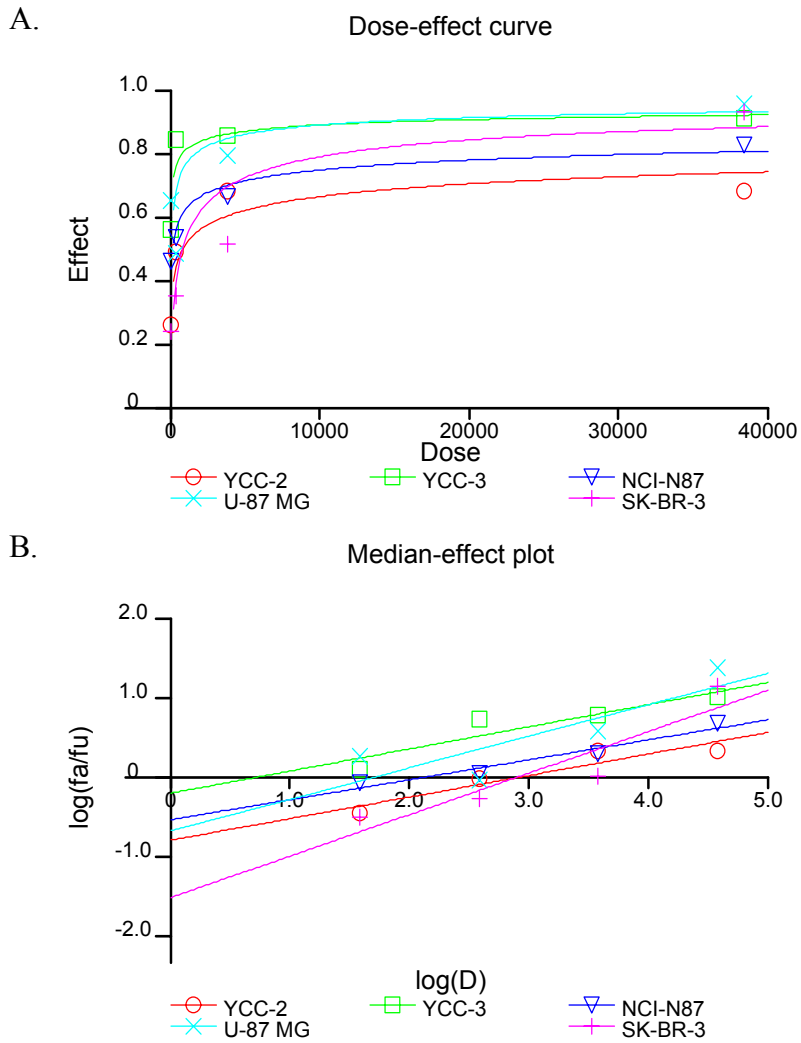


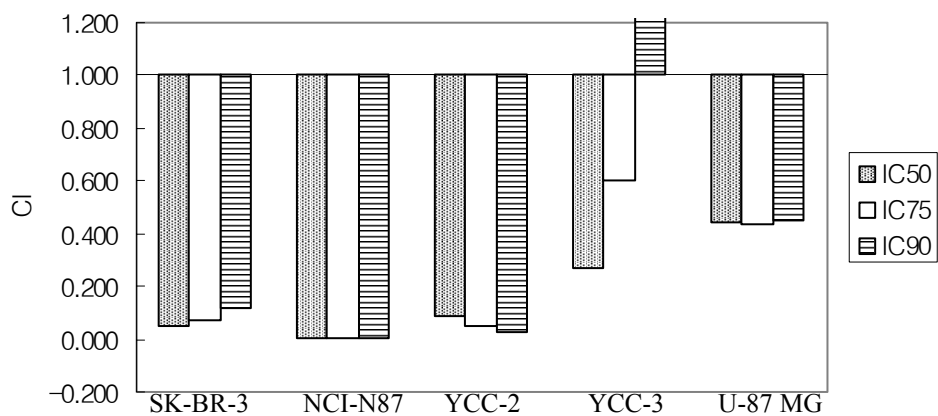
Fig. 5. Chemosensitivity of paclitaxel in gastric cancer cell lines.
A. Dose-effect curve; B. Median-effect curve



**Fig. 6. Chemosensitivity of 5-FU in gastric cancer cell lines.
 A. Dose-effect curve; B. Median-effect curve**

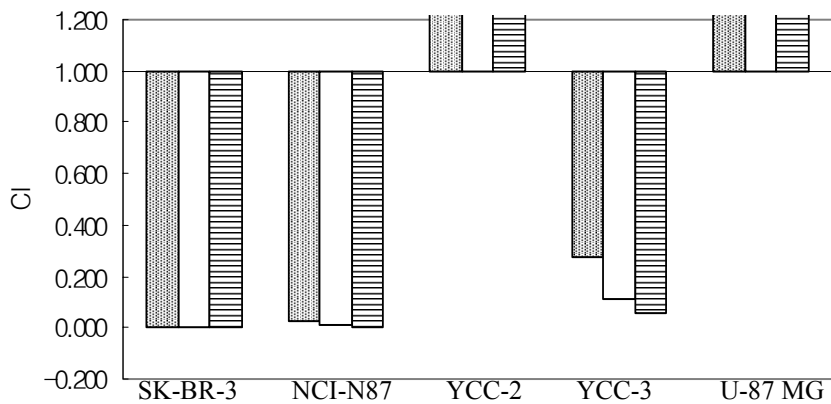
A.

Doxorubicin



B.

Cisplatin



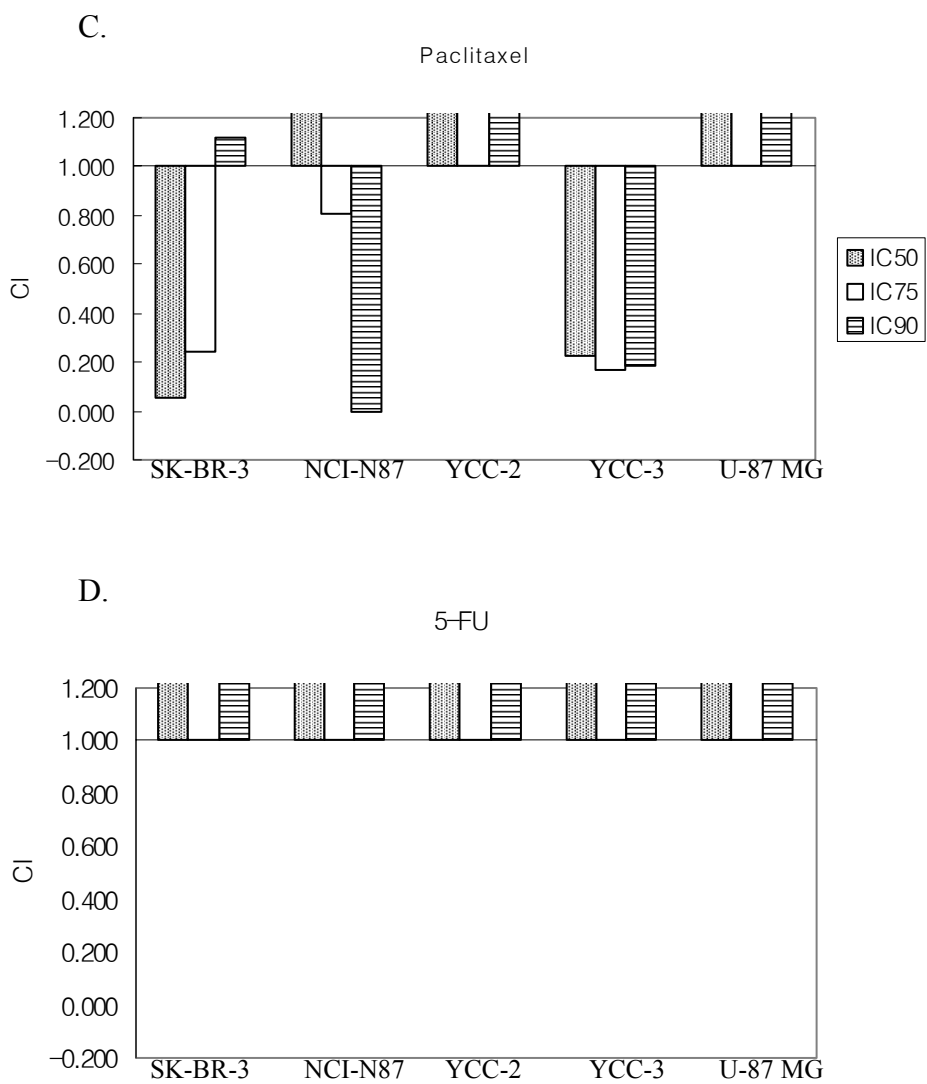


Fig. 7. Combination Index as a growth inhibitory effect of combination treatment with Herceptin[®] and anti-cancer agents A.doxorubicin, B. cisplatin, C. paclitaxel, D. 5-FU

IV. 고 찰

신호전달의 시발인 성장인자나 성장인자 수용체는 과발현되면 세포의 성장에 큰영향을 미치게 됨은 물론 세포를 암변형에 이르게까지 할 수 있다. 전암유전자는 세포의 성장, 발달 및 분화과정에 중추적인 역할을 담당하며 성장인자나 수용체, 혹은 신호전달체계에 관여하여 세포의 정상적인 증식제어기능의 상실을 유도하여 종양세포로의 전환을 유발할 수 있다. 섬유아세포 성장인자군에 속하는 FGF-5, TGF- α , EGF, EGF 수용체 등은 모두 과발현되면 세포를 암화시킬 수 있다.

HER-2/*neu* 단백질은 인간의 유방암 세포주에서 처음으로 발견된 이후⁴ 유방암에서의 연구가 활발히 이루어져 현재까지 유방암 환자의 약 30%에서 과발현되는 것으로 보고되고 있으며 생체 외 실험과 동물실험을 통해 유방암 발생의 초기단계에 관여하고²⁸, 재발율을 증가시키며 전이를 유도하고, 또한 호르몬 치료에 대한 반응을 저하시켜 유방암의 불량한 예후인자로서 인식되었다^{5,25}. 유전자는 염색체 7번에 위치하는 EGFR유전자 및 v-erbB 종양유전자와 구조적으로 밀접한 관련이 있는 종양유전자로 17번 염색체의 q21에 위치하고 있다. 이는 transmembrane domain에서 점상 돌연변이에 의해 활성화된 전환 유전자로 4.8kb의 mRNA의 합성을 통해

분자량 185kd의 tyrosine kinase계통의 당단백질을 생성한다.

HER-2/*neu* 단백질은 정상조직에서는 발현이 거의 없고 원발성이나 전이성 암조직에서는 균질하게 발현이 되므로 치료의 표적으로 제시되고 있으며, 이를 차단하는 항-HER-2/*neu* 항체는 실제로 생체 외 실험과 동물 실험을 통해 유방암 세포주에서 높은 세포독성도를 나타내었다^{29,30}. HER-2/*neu*의 extracellular region에 대한 항체인 항-HER-2/*neu* 항체는 인간의 면역글로부린 분자구조에 murine antigen binding region을 삽입함으로 사람에게 사용할 수 있도록 만든 인간재조합 HER-2/*neu* 단일 항체인 Herceptin[®]으로 발전하게 되어, 전이성 유방암 환자에 대한 임상실험 결과 약 21%의 반응율을 보이고 함께 투여한 항암제의 반응율도 증가시킴이 보고되었다³¹. Park등은 인체 위암조직에서 HER-2/*neu* 유전자 및 그 단백질발현을 조사하여 위암 발생과정과 깊은 연관성이 있음을 보고하였고, Yonemura등은 HER-2/*neu* 단백질의 과발현시 위암의 예후에 나쁜 영향을 미침을 보고하여 유방암에서처럼 HER-2/*neu* 단백질 발현시 항-HER-2/*neu* 항체 사용이 유용할 것으로 추측된다³².

한편 위암은 현재까지 증명된 유일한 완치치료법이 수술이며 완치적 수술후에도 약 80%의 환자에서 국소재발 혹은 전이성 재발이 발생하여 수술후 보조적 항암요법이나 전이성 암에서의

유도항암요법이 필요하다. 그러나 위암에서 사용되는 약제는 5-FU를 비롯하여 doxorubicin, cisplatin, mitomycin 및 paclitaxel 등으로 그 반응율이 15-30%정도에 불과하여 위암의 발생기전에 대한 연구 및 보다 새로운 치료법이 요구되고 있다³³.

본 실험에서는 먼저 3가지 위암 세포주 (YCC-2, YCC-3, NCI-N87)에 대해 HER-2/*neu* 단백 발현을 조사하여 단백 발현이 강양성인 NCI-N87 와 중양성인 YCC-2 위암 세포주, 그리고 약양성인 YCC-3 위암 세포주로 정하였다. HER-2/*neu* 단백 발현을 조사하는데 있어서 면역조직학적 염색법은 객관화가 낮아, flow cytometry 방법을 시행하였다. 암세포주에 대한 성장억제 효과를 관찰하기 위해 doxorubicin, cisplatin, paclitaxel 및 5-FU 4가지 항암제를 선택하였는데 이는 위암에서 비교적 기본 약제로 사용되거나 현재 효과가 인정되고, 유방암에서 Herceptin[®]과 함께 사용하여 약제의 상승효과 (synergic effect)가 밝혀진 약제들이다.

Herceptin[®]의 세포성장 억제효과는 SK-BR-3에서 최고 IC₄₀까지 관찰되었는데 이는 약제의 반감기가 짧아 (72시간) 기본적인 MTT 검사에서 요구되는 시간 (96시간)까지 약제가 남아있지 않아 나타난 결과 일수도 있다고 생각된다. 또한 Herceptin[®]이 성장인자 수용체에 작용하는 cytostatic agent이고, HER-2/*neu*을 통한 세포성장 pathway가 차단되더라도 다른 pathway를 이용하여

암세포주의 성장을 유발할 수도 있어, 약제의 농도를 더 증가시켰으나 세포 성장의 억제 정도에는 유의한 차이는 없었다. 본 실험에서 사용된 Herceptin®의 용량은 안체내 투여가 가능한 최대 농도로 시행하였으며 이 농도가 유방암에서 확립된 농도이므로 위암과의 차이점을 시사한다 하겠다.

4가지 항암제에 대한 단일 약제감수성 검사에서는 HER-2/*neu* 단백질발현이 강양성인 SK-BR-3 유방암 세포주에선 농도의존적으로 세포성장 억제효과가 관찰되었다. 특히 doxorubicin의 경우 모두 의미있는 세포성장 억제효과가 관찰되었는데 이는 여러 연구에서처럼 HER-2/*neu* 단백질 발현과 doxorubicin에 대한 반응사이의 상관관계가 있음을 알 수 있었다³⁴. 그러나 cisplatin의 경우 HER-2/*neu* 단백질이 강양성인 NCI-N87 위암 세포주에서는 약제의 농도가 증가함에 따라 세포성장 억제효과가 관찰되지 않았고 나머지 세포주에서는 의미있는 성장 억제효과가 나타났다. 한편 Paclitaxel에 대해서도 HER-2/*neu* 단백질발현 유무와 상관없는 약제감수성의 결과를 보였는데, Yu 등³⁵의 약제저항성 및 Baselga 등³⁶의 약제감수성을 모두 관찰할 수 있어 향후 연구가 더 필요하리라 생각된다.

Herceptin과 항암제의 상호작용인 상승 (synergism), 유지 (summation), 길항 (antagonism) 효과는 HER-2/*neu* 단백질발현의

정도나 그 발현과정인 phosphorylation의 변동은 아닌 것으로 제시되고 있다²⁰. Doxorubicin은 여러 연구에서 EGFR나 transforming growth factor (TGF)- α 와 같은 성장인자의 발현을 증가시켜 항-EGFR 단일 항체를 함께 사용시 상승적인 세포성장억제 효과가 관찰되고 있다. Doxorubicin의 경우 병용투여시 의미있는 세포성장 억제효과가 관찰되었는데 이는 여러 연구에서처럼 HER-2/*neu* 단백질 발현과 doxorubicin에 대한 반응사이의 상관관계가 있음을 알 수 있었다. Cisplatin은 DNA adduct를 형성함으로써 약제의 세포독성도를 보이는데 이는 복제 (replication)와 전사 (transcription)와 같은 DNA 가닥의 분리를 요구하는 세포과정을 방해함으로써 발생되며³² 이때 anti-HER-2/*neu* 항체를 전처치하는 경우 cisplatin에 의해 생성되고 DNA adducts의 회복 (repair) 능력이 감소하게 된다²⁵. 본 실험에서는 HER-2/*neu* 단백질이 강양성인 NCI-N87 위암 세포주에서는 IC₂₀, YCC-2에서는 IC₁₀ 용량에서 그리고 음성관정 기준세포인 U-87 MG에서는 길항효과가 나타났으며 나머지 세포주에서는 성장억제효과가 나타났다. Paclitaxel에 대해서도 농도가 증가함에 따라 상승효과가 관찰되었는데 Chang등³²의 보고에 의하면 위암 세포주에서 paclitaxel은 apoptosis전에 주로 G2/M-phase의 arrest뿐 아니라 G0/G1-phase에 있는 세포에도 세포독성도를 나타낸다³⁷.

Herceptin[®]과 병용처리의 paclitaxel과의 약물 상호작용은 paclitaxel에 의해 G2/M phase에 arrest된 세포에서 Herceptin[®] 처리로 M-phase로의 cell progression이 더욱더 down-modulation되어 세포독성도가 증가된다고 생각된다. 또한 Herceptin[®] 처리시 G0/G1 phase에 있는 세포가 증가하게 되는데²⁷ 이때 paclitaxel에 민감하게 반응하여 세포독성도가 증가된다고 생각된다. Herceptin[®]과 5-FU를 병용투여 하였을 때는 모든 세포주에서 길항효과 (CI>1)가 나타났다.

결론적으로 여러 종류의 위암 세포주에서 세포 유형에 따라 HER-2/*neu* 단백발현 정도에 차이가 있으며 그 발현여부나 발현정도에 따라 위암에서 주로 사용되는 항암제 (doxorubicin, cisplatin, paclitaxel 및 5-FU)를 결정해야 한다고 생각된다.

V. 결 론

위암 세포주에서 HER-2/*neu* 단백질 발현을 조사하고 이때 재조합 인간형 HER-2/*neu* 항체인 Herceptin[®]과 항암제 (doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, 5-FU)의 단독 혹은 복합투여 후의 반응율을 조사하였다.

1. 3가지 위암 세포주 (YCC-2, YCC-3, NCI-N87)에 대해 HER-2/*neu* 단백질 발현은 NCI-N87이 강양성(88%), YCC-2이 중양성(55%) 그리고 YCC-3가 약양성(48%)으로 조사되었다.

2. Herceptin[®] 단독투여시 HER-2/*neu* 단백질 발현에 상관없이 Herceptin[®]의 농도내에서는 양성판정 기준세포인 SK-BR-3가 IC₄₀의 세포성장억제 효과가 관찰되었다. 위암세포주에서는 세포독성능이 충분하게 나타나지 않았다. HER-2/*neu* 단백질 발현에 정도의 차이는 있으나 4가지 항암제 (doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, 5-FU)에 대해서 농도의존성으로 세포성장억제 효과가 관찰되었다.

3. Herceptin과 항암제를 병용투여한 경우 HER-2/*neu* 단백질 발현

정도에 상관없이 Herceptin[®]과 doxorubicin의 경우에 모든 세포주에서 세포성장억제에 상승 효과가 관찰되었고 Herceptin[®]과 5-FU의 경우는 모든 세포주에서 길항효과가 관찰되었다.

여러 종류의 위암세포주에서 세포 유형에 따라 HER-2/*neu* 단백질 발현 정도에 차이가 있으며 그 발현여부나 발현 정도에 따라 위암에서 주로 사용되는 항암제(doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, 5-FU)에 대한 약제 감수성 사이에는 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 약제에 따라서 항-HER-2/*neu* 항체(Herceptin[®])와 함께 투여시 항암제의 세포독성효과를 더욱 증가시킬 수 있어 항암제의 투여용량을 줄이고 항암제에 의한 부작용을 감소시켜, 위암에서도 Herceptin[®]을 이용한 생물학적 치료의 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 암세포주에 따른 반응의 차이가 있으므로 위암에서 Herceptin[®]을 사용할 경우에는 유방암과는 다른 protocol에 의해 시행되어야 할 것이다.

참고 문헌

1. Yarden Y., Sliwkowski M. Untangling the ErbB signaling network. Nature Reviews Mol.Cell. Biol 2001;2:127-137.
2. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. Cell 1991;64:271-280.
3. Tal M, Wetzler M, Josefberg Z, Deuch A. Spoardic amplification of the HER-2/*neu* Protooncogene in adenocarcinomas of various tissue. Cancer Res 1988;48:1517.
4. King CR, Kraus MH, Aronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in human mammary carcinoma. Science 1985;229:974-976.
5. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WH, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of the HER-2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989;244:707-712.
6. Reese D. M., Slamon D. J. HER-2/*neu* signal transduction in human breast and ovarian cancer. Stem Cells 1997;15:1-8.
7. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/*neu*: A review. semin Oncol 1999;26(4) suppl 12:51-59.
8. Sahin AA. Biologic and clinical significance of HER-2/*neu*(c-erbB-2) in breast cancer. Advances in Anatomic Pathology 2000;7:158-166.

9. Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G., Levin W. J., Ullrich A., McGuire W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
10. Meden H., Marx D., Roegglen T., Schauer A., Kuhn W. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/*neu*) and response to chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Pathol* 1998;17:61-65.
11. Tanner B., Kreutz E., Weikel W., Meinert R., Oesch F., Knapstein P. G., Becker R. Prognostic significance of c-erbB-2 mRNA in ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol* 1996;62:268-277.
12. Meden H., Kuhn W. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/*neu*) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 1997;71:173-179.
13. Gorlick S, Dolar E, Yerci O, Samli B, Oztura H, Nak SG, Gulden M, Memik F. The relationship between c-erbB-2 oncogene expression and clinicopathological factors in gastric cancer. *J Int Med Res* 1999;27:74-78.
14. Tyson F. L., Boyer C. M., Kaufman R., O'Briant K., Cram G., Crews J. R., Soper J. T., Daly L., Fowler W. C., Jr., Haskill J. S., et al Expression and amplification of the HER-2/*neu* (c-erbB-2) protooncogene in epithelial ovarian tumors and cell lines. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1991;165:640-646.
15. Ross J. S., Fletcher J. A. The HER-2/*neu* oncogene in breast cancer:

- prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998;16:413-428.
16. Ignatoski K. M., Maehama T., Markwart S. M., Dixon J. E., Livant D. L., Ethier S. P. ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br. J. Cancer* 2000;82:666-674.
 17. Tzahar E., Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim. Biophys. Acta* 1998;1377:25-37.
 18. Baselga J., Norton L., Albanell J., Kim Y. M., Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin®) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/*neu*-overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998;58:2825-2831.
 19. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987;237:178-182.
 20. Pegram M. D., Sheree H. Inhibitory effects of combination of HER-2/*neu* antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999;18:2241-2251.
 21. Park JB, Rhim JS, Kim SW, Kraus MH. Amplification, overexpression, and rearrangement of the *erbB-2* protooncogene in primary human

- stomach carcinomas. *Cancer Res* 1989;49:6605-6609.
22. Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991;51:1034-1038.
23. Sliwkowski M. X., Lofgren J. A., Lewis G. D., Hotaling T. E., Fendly B. M., Fox J. A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin[®]). *Semin. Oncol* 1999;26(4) suppl 12:60-70.
24. Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J., Baughman S., Benz C. C., Dantis L., Sklarin N. T., Seidman A. D., Hudis C. A., Moore J., Rosen P. P., Twaddell T., Henderson I. C., Norton L. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin[®]) in patients with HER2/*neu*-overexpressing metastatic breast cancer. *Semin. Oncol* 1999; 26(4)suppl 12:78-83.
25. Pegram M. D., Slamon D. J. Combination therapy with trastuzumab (Herceptin[®]) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin. Oncol* 1999; 26(4)suppl 12:89-95.
26. Chou T. C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enz. Regul* 1984;22:27-55.

27. Chou T. C., Motzer R. J., Tong Y., Bosl G. J. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan and cisplatin against teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J. Natl. Cancer. Inst. (Bethesda)* 1994;86:1517-1524.
28. Revillion F, Bonnatarre J, Pey JP. ErbB-2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998;34:791-808.
29. Hudziak RM, Lewin GH, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989;9:1165-1172.
30. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(5):1746-1750.
31. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs, H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
32. Chang YF, Li LL, Wu CW, Liu TY, Lui WY, P'eng FK, Chi CW. Paclitaxel-induced apoptosis in human gastric carcinoma cell lines. *Cancer*

1996;77(1):14-18.

33. DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer: principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott, 2001.
34. Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observation in gastric cancer. Seminar in oncol 1996;23:307-315.
35. Baselga J, Seidman AD, Rosen PP, Norton L. HER2 overexpression and paclitaxel sensitivity in breast cancer: therapeutic implications. Oncology 1997;11(3 Suppl 2):43-48.
36. Yu D, Liu B, Tan M, Li J, Wang SS, Hung MC. Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms. Oncogene 1996;13:1359-1365.
37. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst 1998;90:1361-1370.

Abstract

Correlation of HER-2/*neu* (erbB-2) expression and combined effect of HERCEPTIN[®] and chemotherapeutic agents in gastric cancer cell lines

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

Jeong Beom Kim

Directed by Professor Hyun Cheol Chung

Gastric cancer is the most common malignancy in Korea. Although advanced gastric cancer has many limitations and response rate is marginal in chemotherapy. Overexpression of human HER-2/*neu* gene and its protein are associated with increased cell division and a high rate of tumor growth and have been reported in several malignancies. Especially, approximately 30% of breast cancer patients have overexpression of HER-2/*neu* protein and the overexpression metastasize faster, induces resistance of the chemotherapy and down-regulate function of estrogen receptor. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin[®]) inhibits proliferation of HER-2/*neu*

overexpressing tumor cells and the use of that in combination in metastatic breast cancer have increased cytotoxicity of chemotherapeutic agents.

In this study, we evaluated followings: ① the expression of HER-2/*neu* protein in gastric cell lines by FACS, ② comparing the cytotoxicity in chemotherapeutics (doxorubicin, cisplatin, paclitaxel, 5-FU) alone and in combination with Herceptin[®] according to the expression of HER-2/*neu* protein by MTT assay

1. After evaluation of the expression of HER-2/*neu* protein in three gastric cancer cell lines (YCC-2, YCC-3, NCI- N87), NCI-N87 (88%) gastric cancer cell line with strong positivity of HER-2/*neu* expression. YCC-2 (55%) and YCC-3 (48%) gastric cancer cell line with intermediated, weak positivity respectively. SK-BR-3 (89%) breast cancer cell line and U-87 MG (6%) brain cancer cell line were selected for HER-2/*neu* positive, negative control respectively.

2. In vitro MTT assay for treatment of Herceptin[®], cell growth dose-dependently inhibited in HER-2/*neu* positive control cell line SK-BR-3. Although dose of Herceptin[®] increased, Growth inhibition was not observed in HER-2/*neu* negative control cell line U-87 MG. Effective growth inhibition

was not observed in gastric cancer cell lines with single treatment of Herceptin[®], all cell lines observed the dose-dependent growth inhibition to chemotherapeutic agents(doxorubicin, cisplatin, paclitaxel and 5-FU).

3. In combination of Herceptin[®] with chemotherapeutic agents, comparing the drug sensitivity by CI (combination index), combination of Herceptin[®] with doxorubicin observed synergistic effects in all cancer cell lines except YCC-3, combination of Herceptin[®] with cisplatin observed NCI-N87 and SK-BR-3 and combination of Herceptin[®] with paclitaxel observed synergistic effects in YCC-2. combination of Herceptin[®] with 5-FU observed antagonistic effects in all cancer cell lines.

In conclusion, According to HER-2/*neu* expression level, effect of anti-cancer agents was observed differently in combination of Herceptin[®] With chemotherapeutic agents. This suggest that HER-2/*neu* expression level can be applied standard of combination drug selection in combination of Herceptin[®] With chemotherapeutic agents in gastric cancer.

Key words : HER-2/*neu*(erbB-2), HERCEPTIN[®], gastric cancer cell line, combination treatment, CI.