

## Medroxyprogesterone Acetate가 인체 신세포암 세포주에서 Vinblastine의 세포독성도에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이동현 · 정병하 · 홍성준

=Abstract=

### The Effect of Medroxyprogesterone Acetate on Cytotoxicity of Vinblastine in Renal Cell Carcinoma Cell Lines

Dong Hyeon Lee, Byung Ha Chung, Sung Joon Hong

*From the Department of Urology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Inadequate effectiveness of anticancer drug in treating renal cell carcinoma has been attributed to the overexpression of multidrug resistance gene (MDR1) and its product, membrane-bound P-glycoprotein. P-glycoprotein is known to actively pump out intracellular drug, which results in low intracellular anticancer drug concentration. Progesterone, which has been used in patients with advanced renal cell carcinoma is found to cause a three to four-fold increase in vinblastine accumulation in the P-glycoprotein-expressing murine macrophagelike cell line. We have studied to evaluate the MDR modulating action of medroxyprogesterone acetate (MPA) in renal cell carcinoma cell lines also with tamoxifen and verapamil.

A-498 of a high *mdr1* expressed cell line and Caki-2 of a low *mdr1* expressed cell line were each placed in 96 multiwell plates. Vinblastine, in concentration from 0.01  $\mu\text{g/ml}$  to 10  $\mu\text{g/ml}$  was added to each well and verapamil, from 0.1  $\mu\text{M}$  to 10  $\mu\text{M}$ , MPA, from 2.5  $\mu\text{M}$  to 25  $\mu\text{M}$ , or tamoxifen, from 0.1  $\mu\text{M}$  to 10  $\mu\text{M}$  was also added. The *in vitro* chemosensitivity of two renal cell carcinoma cell lines (Caki-2 and A-498) to vinblastine was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazol bromide(MTT) colorimetric assay.

Growth of Caki-2 cells is inhibited by low doses of vinblastine( $\text{IC}_{50}$ : 0.27  $\mu\text{g/ml}$ ), but A-498 cells are highly resistant to the drug, with  $\text{IC}_{50}$  value of 0.47  $\mu\text{g/ml}$ . The chemosensitivity of the A-498 cells is increased in response to 5  $\mu\text{M}$  MPA, 1  $\mu\text{M}$  verapamil and 2  $\mu\text{M}$  tamoxifen, which are known to partially reverse the MDR phenotype in other resistant tumors. The effective concentration of MPA for MDR reversal is in clinically achievable concentration but one of verapamil is not. The chemosensitivity of Caki-2 cells does not change according to MDR modulating agents.

MPA is an effective MDR modulating agents to enhance the cytotoxicity of vinblastine in renal cell carcinoma cell line showing P-glycoprotein expression. It suggests that combination therapy of MPA and vinblastine is better than monotherapy with MPA or vinblastine alone.

**Key Words:** Renal cell carcinoma cell line, Multidrug resistance, Vinblastine, Medroxyprogesterone acetate.

## 서 론

신세포암을 포함하여 유방암, 간암, 백혈병, 연조직육종 등은 vinca alkaloids나 anthracyclines 등과 같은 화학요법에 다중약제내성을 나타낸다. 이의 주된 기전은 다중약제내성 유전자(multidrug resistance gene: MDR1)의 증가된 표현으로 과생성된 세포질막 p-glycoprotein(p-170)에 의해 세포내 약물이 능동적으로 세포외로 배출되어 세포내에 낮은 약물 농도가 유지되는 방어 기전으로 생각되고 있다<sup>1</sup>. 이러한 약제내성의 기전이 알려지면서 이를 역전시켜 항암제의 내성을 극복하려는 연구들이 진행되고 있으며 calcium channel blocker인 verapamil과 quinidine을 비롯하여 cyclosporin A, tamoxifen 등 여러 가지 종류의 약제내성 역전제들이 보고되었으나 약제마다 제한이 있어 실제 임상투여가 어려운 실정이다.

Medroxyprogesterone acetate(MPA)는 1970년대부터 전이 신세포암에 사용되고 있는 약제로 그 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않으나 부작용이 적고 진정효과 및 골수보호 작용 등으로 환자의 전신상태를 호전시킨다는 점에서 흔히 쓰여지고 있다. Huang 등<sup>2</sup>의 보고에 의하면 progesterone이 P-glycoprotein을 발현하는 쥐의 유사 대식세포에서 이의 작용을 방해하여 세포내 vinblastine의 농도를 3-4배 증가시키는 것으로 밝혀져 여러 가지 암세포에서 progesterone이 다중약제내성에 미치는 약리작용에 대한 연구가 진행되어 왔으나 신세포암에서는 약제내성 역전제로서의 역할에 대한 연구가 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 약제내성을 갖는 신세포암 세포주에서 기존에 보고된 verapamil, tamoxifen 등의 효과와 함께 MPA가 vinblastine의 세포독성도에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 가. 세포주

인체 신세포암 세포주로는 MDR의 발현정도가 높은 A-498을 MDR 양성 세포주로 선정하고 MDR의 발현이 거의 없는 Caki-2를 MDR 음성 세포주로 하였다<sup>3</sup>. 이들 세포주는 한국 세포주

연구재단에서 구입하였다.

#### 나. 항암제 및 다중내성 역전제

단독 약제로 신세포암에 가장 높은 반응을 보이는 vinblastine을 항암제로 사용하였고 다중약제내성 역전제로 MPA 및 verapamil, tamoxifen을 사용하였다. 이들 약제는 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

#### 다. 배지 및 배양환경

가열 비활성화(56°C, 30분) 되어진 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum; GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.; 이하 FBS로 약함)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에 100unit/ml의 penicillin과 100 µg/ml의 streptomycin을 첨가하여 만든 배지를 사용하였으며 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 100% 상대습도의 배양기 내에서 배양하였다.

## 2. 실험 방법

### 가. 적정 세포수의 결정

배양 중인 세포주를 trypsin(GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) 처리하여 완전배지로 단일 부유 암세포를 만든 후 실온에서 1200 rpm으로 10분간 원심세척을 3회 실시하였다. 상층액을 버리고 다시 완전 배지에 넣어 pipette으로 충분히 분리시켜 단세포 현탁액을 만든 후 15 µl를 취하여 trypan blue 15 µl와 잘 섞은 후 세포수와 생존율을 측정하여 95%의 단세포율과 90%이상의 생존율을 확인한 후 단세포 현탁액을 96 well 미세적정판의 제 2번 열의 5개행에 세포수를 5 × 10<sup>5</sup>, 2.5 × 10<sup>5</sup>, 10 × 10<sup>4</sup>, 5 × 10<sup>3</sup>, 1 × 10<sup>3</sup> 까지 96 well 미세적정판에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 5일간 배양 후 MTT 방법<sup>4</sup>을 이용하여 성장세포수를 측정하여 5일간 계속 성장할 수 있는 세포수를 적정 세포수로 하였다.

### 나. Vinblastine의 50% 살상 농도 측정

배양 중인 세포주를 단일 부유 암세포로 만든 후 각 well당 10 × 10<sup>3</sup>개의 세포를 넣고 24시간 배양 후 vinblastine을 넣어 각 well당 vinblastine의 농도가 10µg/ml, 3µg/ml, 1µg/ml, 0.3µg/ml, 0.1µg/ml, 0.03µg/ml, 0.01µg/ml가 되도록 하여 4일간 배양한 다음 MTT 검사법으로 각 농도에 따른 광학 밀도를 측정한다. vinblastine을 넣지 않은 대조군과 비교하여 생존분획을 다음 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\% \text{ 생존율} = \frac{\text{실험군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}}{\text{대조군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}} \times 100$$

모든 실험은 3회 이상 반복 실험하여 그 평균치를 계산하고 vinblastine의 농도를 log 환산식으로 처리하여 vinblastine에 대한 IC<sub>50</sub>(대조군에 비하여 세포성장을 50% 억제시키는 약제 농도)를 구하였다.

#### 다. Vinblastine의 세포독성도에 미치는 다중약제 내성 역전제의 영향

배양중인 세포주를 단일 부유 암세포로 만든 후 각 well당  $10 \times 10^3$ 개의 세포를 넣고 24시간 배양 후 vinblastine을 넣어 각 well당 vinblastine의 농도가 10 $\mu$ g/ml, 3 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 0.3 $\mu$ g/ml, 0.1 $\mu$ g/ml, 0.03 $\mu$ g/ml, 0.01 $\mu$ g/ml가 되도록 하고 이에 MPA는 25 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 2.5 $\mu$ g/ml의 농도를, verapamil은 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 0.1 $\mu$ g/ml의 농도를, tamoxifen은 10 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 2 $\mu$ g/ml, 2.5 $\mu$ g/ml의 농도를 적용하여 4일간 배양한 다음 MTT 검사법으로 각 농도에 따른 생존 분획을 공식을 이용하여 계산하였다.

#### 라. 통계처리

통계검정은 Mann-Whitney test를 이용하고 p 값이 0.05이하인 경우를 의미 있는 것으로 평가하였다.

## 결 과

### 1. 적정세포수 및 Vinblastine의 50% 살상도

A-498 세포주와 Caki-2 세포주에서 MTT 측정법을 이용하여 계산한 적정 세포수는  $10 \times 10^3$ /ml,  $9 \times 10^3$ /ml이었으며 vinblastine에 대한 각 세포주의 IC<sub>50</sub>는 A-498 세포주가  $0.47 \pm 0.03 \mu$ g/ml, Caki-2가  $0.27 \pm 0.03 \mu$ g/ml로 MDR의 발현정도가 낮은 Caki-2 세포주는 낮은 농도의 vinblastine에서도 세포의 성장이 억제되었으나 MDR의 발현정도가 높은 A-498 세포주에서는 Caki-2에 비하여 세포성장을 억제시키는 vinblastine의 농도가 높았다.

### 2. MPA 및 verapamil, tamoxifen의 vinblastine 세포독성도에 미치는 영향

MDR의 발현정도가 높은 A-498 세포주에서

Table 1. Effect of medroxyprogesterone acetate on vinblastine cytotoxicity in A-498 and Caki-2 cell

Concentration of MPA( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> of vinblastine <sup>T</sup> ( $\mu$ g/ml)	
	A-498 cell line	Caki-2 cell line
0	$0.47 \pm 0.03$	$0.27 \pm 0.04$
2.5	$0.49 \pm 0.09$	$0.29 \pm 0.10$
5	$0.16 \pm 0.06^*$	$0.23 \pm 0.01$
10	$0.13 \pm 0.03^*$	$0.27 \pm 0.03$
25	$0.11 \pm 0.01^*$	$0.29 \pm 0.15$

<sup>T</sup>mean  $\pm$  standard deviation, \*p<0.05, by Mann-Whitney test.

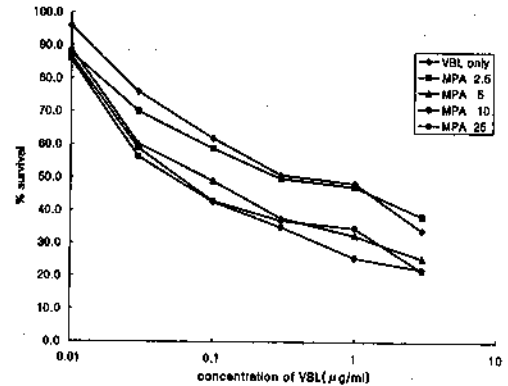


Fig. 1. Effect of medroxyprogesterone acetate on vinblastine cytotoxicity in A-498 cell line.

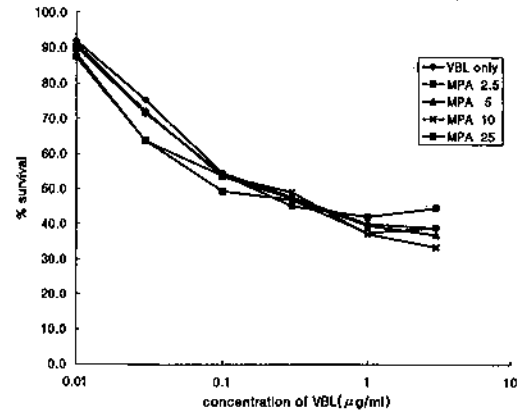


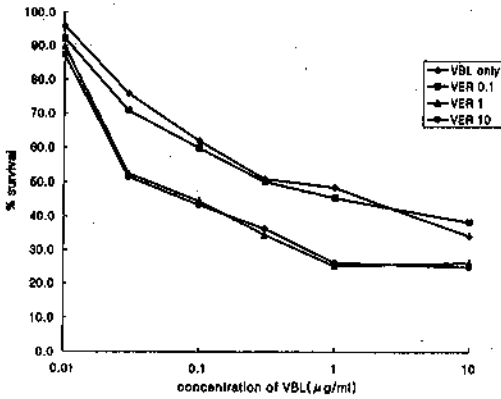
Fig. 2. Effect of medroxyprogesterone acetate on vinblastine cytotoxicity in Caki-2 cell line.

MPA 2.5 $\mu$ M 첨가하였을 때 MPA를 첨가하지 않은 경우와 vinblastine의 IC<sub>50</sub> 치가 차이를 보이지 않았으나 5 $\mu$ M 첨가 시부터 IC<sub>50</sub> 치가 현저히 저하되었다. MDR의 발현정도가 낮은 Caki-2 세포주에서는 vinblastine의 IC<sub>50</sub> 치가 MPA의 첨가에 무관하였다(Table 1, Fig. 1, 2).

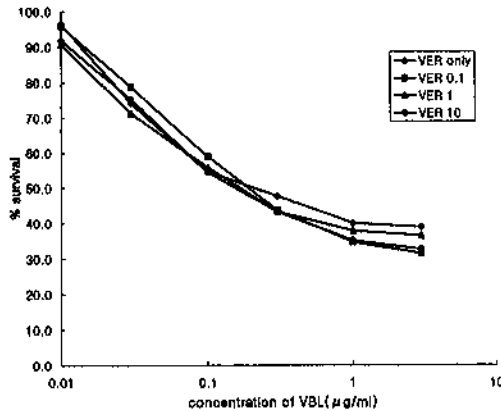
**Table 2.** Effect of verapamil on vinblastine cytotoxicity in A-498 and Caki-2 cell line

Concentration of Verapamil( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> of vinblastine <sup>T</sup> ( $\mu$ g/ml)	
	A-498 cell line	Caki-2 cell line
0	0.47 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.04
0.1	0.48 $\pm$ 0.08	0.30 $\pm$ 0.01
1	0.13 $\pm$ 0.11*	0.30 $\pm$ 0.06
10	0.11 $\pm$ 0.01*	0.28 $\pm$ 0.03

<sup>T</sup>mean  $\pm$  standard deviation, \*p<0.05, by Mann Whitney test.



**Fig. 3.** Effect of verapamil on vinblastine cytotoxicity in A-498 cell line.



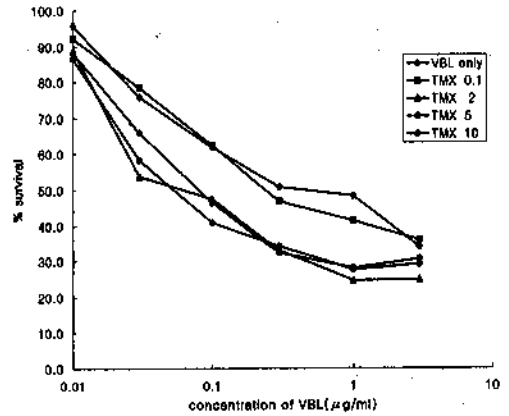
**Fig. 4.** Effect of verapamil on vinblastine cytotoxicity in Caki-2 cell line.

Verapamil은 A-498 세포주에서 1 $\mu$ M 첨가 시부터 첨가하지 않은 경우에 비해 vinblastine의 IC<sub>50</sub> 치가 현저히 저하되었으며 Caki-2 세포주에서는 verapamil의 농도에 관계없이 vinblastine의 IC<sub>50</sub> 치가 유의적인 변화를 보이지 않았다(Table 2, Fig. 3, 4).

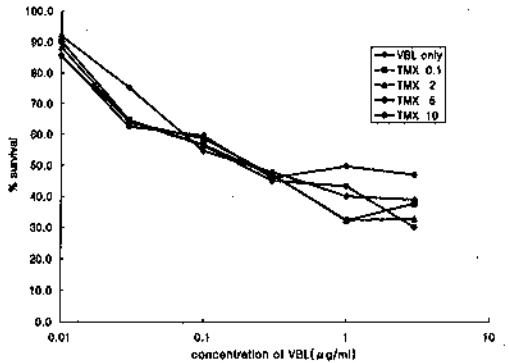
**Table 3.** Effect of tamoxifen on vinblastine cytotoxicity in A-498 and Caki-2 cell line

Concentration of Tamoxifen( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> of vinblastine <sup>T</sup> ( $\mu$ g/ml)	
	A-498 cell line	Caki-2 cell line
0	0.47 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.03
0.1	0.43 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.08
2	0.15 $\pm$ 0.11*	0.25 $\pm$ 0.13
5	0.19 $\pm$ 0.08*	0.27 $\pm$ 0.05
10	0.14 $\pm$ 0.04*	0.24 $\pm$ 0.09

<sup>T</sup>mean  $\pm$  standard deviation, \*p<0.05, by Mann Whitney test.



**Fig. 5.** Effect of tamoxifen on vinblastine cytotoxicity in A-498 cell line.



**Fig. 6.** Effect of tamoxifen on vinblastine cytotoxicity in Caki-2 cell line.

Tamoxifen은 2 $\mu$ M 첨가 시부터 첨가하지 않은 경우에 비해 A-498 세포주의 vinblastine에 대한 IC<sub>50</sub> 치를 유의있게 변화시켰다(Table 3, Fig. 5, 6).

### 고찰

지난 30년 동안 다른 고형 종양에 있어 화학요

법제는 놀라운 발전을 하였는데 반해 진행된 신세포암에 있어서는 유효한 화학요법 약제나 약제의 조합을 찾지 못했다는 것은 안타까운 일이다. 이는 암세포의 항암제에 대한 다중약제내성으로 인한 것이며, 그 중 특히 MDR 유전자의 증폭과 과잉발현이 대표적인 기전으로 유전자의 산물인 p-glycoprotein에 의한 능동적 약물 배출 때문인 것으로 알려져 있다<sup>1</sup>. P-glycoprotein은 신장의 신세노관 세포나 유방의 상피세포, 장점막, 전립선상피세포 등 분비기능을 가지고 있는 정상 조직에서 발견되며 이들 조직에서 유래된 종양은 흔히 P-glycoprotein의 과표현을 보이는데<sup>2</sup> 실제로 신세포암에서는 약 70%에서 MDR1 유전자가 발현된다<sup>3</sup>. 종양의 다중약제내성을 극복하기 위해 여러 가지 종류의 다중약제내성 역전제가 연구되었는데 초기 calcium channel blocker인 verapamil이 MDR1 유전자의 활동을 차단하여 세포내 vinblastine의 농도를 높이는 것으로 밝혀졌으나 유효한 verapamil의 농도가 실제 임상에서 부작용 없이 사용할 수 있는 농도보다 훨씬 고농도인 관계로 임상에 적용하기에는 verapamil의 심장에 대한 독성이 문제가 되어 실제 사용에 제한이 있다<sup>7</sup>. 본 실험에서도 MDR1 유전자의 발현이 높은 A-498 세포주에서 vinblastine의 유효농도를 현저히 감소시키는 verapamil의 농도는 1 $\mu$ M으로 임상에 적용하기에는 매우 높은 농도였다.

Tamoxifen은 유방암의 홀몬 치료제로 널리 쓰이고 있으며 에스트로겐 또는 항에스트로겐 효과와 무관하게 약제내성 극복작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>8</sup>. 김 등<sup>9</sup>은 간암세포주와 폐암세포주에서 tamoxifen이 항암제에 대한 감수성을 증가시킴을 보고한 바 있으며 본 실험에서도 2  $\mu$ M 농도에서 약제내성 발현 신세포암 세포주의 vinblastine 감수성을 의미 있게 증가시켜 이를 확인할 수 있었다.

이 밖에 P-glycoprotein의 작용을 억제하는 약물로는 quinidine, cyclosporin A 등이 있으나 verapamil과 같이 quinidine은 효과적으로 P-glycoprotein의 작용을 억제하는 용량에서 심장 등의 독성으로 인해 생체 적용이 불가능한 것으로 알려져 있고 cyclosporin A는 유효한 농도에서 생체내의 P-glycoprotein의 발현을 변화시키지 않으면서 효과적으로 항암 화학요법제의 작용을 도울 수 있는 것으로 알려졌으나 이 약제가 면역억제

제로서 T-helper cell의 작용을 억제하므로 숙주의 항암 면역작용에 좋지 않은 영향을 줄 가능성이 있으며 신기능 장애, 고혈압, 경련, 간기능 장애 등의 부작용이 있을 수 있다. 반면 MPA는 비교적 독성이 없는 스테로이드계로 특별한 부작용 없이 사용할 수 있는 장점이 있으며 5 $\mu$ M의 농도에서 vinblastine의 IC<sub>50</sub>치를 의의 있게 감소시켜 신세포암에서 p-glycoprotein의 작용을 유효농도에서 억제하는 것을 본 실험에서도 알 수 있었다. 이 밖에 MPA는 신세포암에 대한 최소한의 치료효과와 동화효과, 전정효과 및 골수보호 작용 등으로 전이 신세포암 환자의 전신 상태를 호전시킴으로써 약물투여를 용이하게 하고 치료 용량에서 양호한 전신상태를 유지하게 하는 장점이 있어<sup>10</sup> vinblastine과 병용투여시 vinblastine 단독요법보다 상승효과를 기대할 수 있어 향후 진행된 신세포암 치료의 화학요법에 있어 경제성이나 효율면에서 일조할 것으로 기대된다.

## 결론

진행된 신세포암의 치료에 홀몬치료제로 흔히 사용되었던 MPA가, 다중약제내성 역전제로서 약제내성 신세포암 세포주에 대해 vinblastine의 세포 독작용을 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 이는 향후 전이 신세포암의 약물치료에 있어 MPA가 홀몬치료제 뿐만 아니라 화학요법제의 상승작용을 보조하는 약물로서 vinblastine과 병용투여시 vinblastine의 유효용량을 줄일 수 있는 가능성을 제시하였다고 생각된다.

## REFERENCES

1. Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 14-20.
2. Huang Yang CP, dePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB. Progesterone interact with P-glycoprotein in Multidrug-resistant cells in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* 1989; 264: 782-8.
3. 김형곤, 김현희, 이종욱. Verapamil과 Cyclosporin A가 인체 신세포암 세포주에 대한 vinblastine의 세포독성에 미치는 영향. 대한비뇨학회지 1995; 36: 231-40.
4. Boethling RS, Weaver TL. A new assay for di-

- aphorase activity in reagent formulations, based on the reduction of thiazolyl blue. *Clinical Chemistry* 1979; 25: 2040-2.
5. Valk P, Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Tsuruo T, et al. Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule. *Ann Oncol* 1990; 1: 56-64.
  6. Kanamaru H, Kakehi Y, Yoshida O, Nakanishi S, Pastan I, Gottesman MM. MDR1 RNA levels in human renal cell carcinoma: Correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 844-9.
  7. Lai T, Morgan AP, Smith PJ. The effect of verapamil on the antitumor action of mitoxantrone and doxorubicin against renal carcinoma cells in vitro. *Br J Urol* 1990; 66: 596-601.
  8. Ramu A, Glaubiger D, Fuks Z. Reversal of acquired resistance to doxorubicin in p388 murine leukemia cells by tamoxifen and other triparanol analogues. *Cancer Res* 1984; 44: 4392-5.
  9. 김주향, 김병수, 최정주, 김경미, 유내춘, 최진혁 등. 인체 폐암세포주에서 다약제 내성 극복을 위한 Verapamil, Tamoxifen 및 Cyclosporin A의 효과. *대한암학회지* 1993; 25: 225-35.
  10. 이동현, 홍성준, 정병하, 박동원. 진행된 신세포암에 있어서 Interferon, Vinblastine, Medroxyprogesterone acetate의 병용치료 경험. *대한비뇨학회지* 1996; 37: 639-45.