

## Desferoxamine이 시험관내 인체 간암세포 성장에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실 및 소화기병 연구소, 미생물학교실\*, 의과학교실\*\*

송시영 · 김원호 · 전미연 · 한광협 · 정재복  
전재윤 · 문영명 · 강진경 · 박인서 · 최홍재  
윤정구\* · 김병로\*\* · 이경식\*\*

### 서 론

원발성간암은 우리나라에서 가장 흔한 악성종양의 하나로서<sup>1)</sup>, 근치적 절제가 가장 좋은 치료법이나 진단 당시에 대부분 간경변증이 동반되어 있거나 병변이 진행되어서 외과적절제가 가능한 경우는 극히 제한되어 있다. 최근에는 간동맥색전법, 간동맥내 항암제 주입법, 국소 알코올 주입법, 방사선요법 및 온열요법 등의 다양한 새로운 비수술적 치료법들을 단독 또는 병합 시행하여 효과를 얻고 있다<sup>2-5)</sup>. 그러나 이들 방법 역시 종양의 크기가 작고 간기능의 저하가 없는 일부 환자에서만 시행이 가능하기 때문에 대부분의 간암환자는 항암약물요법 등의 보존적 치료에만 의존할 수 밖에 없다. 항암약물요법에는 adriamycin(ADR), 5-fluorouracil(5-FU), cisplatin(DDP), mitomycin C(MMC), etoposide(VP-16) 및 lomustine(CCNU) 등의 여러 약제들을 단독으로 또는 병합하여 사용하고 있는데 그 반응율은 20% 정도에 불과하여<sup>6-9)</sup>, 항암약물요법의 성적을 향상시킬 수 있는 새로운 약제의 개발 또는 새로운 병합요법이 요망되고 있다.

최근에는 우리가 매일 섭취하는 음식물내의 특정 영양소가 악성종양의 발생 및 성장에 관여하거나 또는 예방적인 효과가 있다는 보고들이 증가하고 있다. 이중 철분은 정상세포는 물론 종양세포에도 필수적인 영양소로 세포의 성장 및 증식에 관여하는 효소들이 활성화되기 위해서 반드시 필요하다. 그러

나 설치류, 가토 및 인체에서 철분 제제를 주사한 후 주사부위에 육종이 발생하였고<sup>10-12)</sup>, 철분의 과잉 축적이 특징인 원발성 혈색소증(idiopathic hemochromatosis) 환자에서 간암의 발생빈도가 정상인에 비해서 200여배나 높으며, 간암 환자의 혈청 철분농도가 간암 이외의 질환이 동반되었던 경우에 비하여 유의하게 높았다는 보고들은 철분의 과잉축적이 간암의 발생과 관련이 있음을 시사하고 있다<sup>13-16)</sup>.

철분은 악성종양의 발생뿐만 아니라 종양의 성장에도 영향을 주는 것으로 알려져 있는데, Bergeron 등<sup>17)</sup>은 백혈병 세포주를 피하 주사한 백서 중 철분이 포함되지 않은 dextran만을 주사한 군에 비해서 철분을 주사한 군에서 종양이 더 빠르게 성장하였다고 하여 암세포의 증식에 철분이 관여한다고 하였다. 또한 Hann 등<sup>18)</sup>은 백서에 대장암, 간암 및 유방암 세포를 이식한 후 철분의 양을 제한한 식이(5 mg/kg)를 공급한 군에서의 종양세포 성장이 철분이 충분히 포함된 식이(312 mg/kg)를 공급한 군에 비해서 둔화되었다고 하여, 철분이 결핍되어 있을 때에는 종양이 서서히 성장하며 이는 desferoxamine(DFO)과 같이 철분을 chelation시키는 약제의 투여에 의하여 종양의 성장속도를 둔화시킬 수 있음을 시사한다고 하였다.

DFO는 미생물인 *Streptomyces pilosus*에 의해 생성되는 hydroxylamine으로 3가 철이온(ferric ion, Fe<sup>+++</sup>)과 결합하여 Fe<sup>+++</sup>의 복합체인 ferrioxamine을 형성하며 인체의 몇몇 악성종양 세포주에 대한 항암효과가 있다고 보고되었다. Robbins 등<sup>19)</sup>은 시험관내에서 배양된 HeLa 세포에 DFO를 투여

접 수 : 1993년 5월 11일  
통 과 : 1994년 3월 22일

한 결과 DNA 합성은 억제되었으나 RNA 및 단백질 합성에는 영향이 없었으며 이와같은 효과를 정상 세포에서는 관찰할 수 없었다고 하여 DFO의 항암 효과를 보고하였다. 또한 Lederman 등<sup>20)</sup>은 DFO가 강력하고 가역적인 DNA 합성 억제효과에 의해 mitogen으로 자극된 인체의 T세포 및 B세포의 성장을 억제하며 hydroxyurea와 마찬가지로 세포내의 deoxyribonucleoside triphosphate 양을 감소시킨다고 하였는데, 이는 철분이 DFO와 결합하므로써 DNA 합성의 첫 단계에 작용하는 효소로 철분에 의해서 활성화되며 ribonucleoside diphosphate를 deoxyribonucleoside diphosphate로 환원시켜서 세포의 분열과정에 필수적인 역할을 하는 효소인 ribonucleotide reductase의 활성도를 억제하기 때문이라고 하였다. 그러나 아직까지 시험관내에서 배양된 악성 종양에서 DFO와 다른 항암제와의 병합효과에 대한 보고는 없으며, 우리나라에 많고 항암제에 대한 반응율이 낮은 간암에서 DFO와 다른 항암제와의 병합효과가 있다면 임상적으로 시도해 볼 수 있을 것으로 기대된다.

항암약물에 대한 감수성 검사에는 시험관내 검사법과 생체내 검사법으로 구분할 수 있는데, 시험관내 검사법 중 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 검사법은 살아 있는 세포가 mitochondria내의 탈수소효소에 의해서 MTT를 환원시킴으로 분광광도법(spectrophotometry)으로 측정이 가능한 청색의 formazan 결정을 형성하는 특성을 이용한 방법으로 재현성이 뛰어나며 예민하고 많은 양의 자료를 분석하기에 매우 효율적이며 간편한 방법으로 최근 널리 이용되고 있다<sup>21-23)</sup>. 한편, 두가지 이상 약제의 병합효과를 판정하기 위해서는 각 약제의 효과를 산술적으로 합하여 약제의 병합효과가 각각의 약제의 효과를 더한 것보다 크거나 혹은 작으면 상승 혹은 길항작용이 있는 것으로 간주하는 산술적인 방법인 additivity model과 사용된 약제들의 동일한 효과를 나타내는 농도의 조합에 의해 그려지는 곡선중 서로 별개의 독립된 양상으로 작용할 경우와 이와 반대로 서로 의존적으로 작용할 경우에 의해 그려지는 두 곡선에 의해 구분되는 구역을 이용하는 기하학적 방법인 isobologram model이 있다. 그러나 대부분의 약제는 비직

선형인 S자형의 용량-반응곡선을 보이므로 직선형 용량-반응곡선일 경우 적용할 수 있는 additivity model은 적합하지 않고 isobologram model을 이용한 분석이 바람직하다고 알려져 있다. 지금까지 isobologram 분석법은 자료를 처리하기 위해서 많은 수의 실험결과가 필요하여 이용에 어려움이 많았으나 최근들어 MTT 검사법의 개발과 더불어 점차 널리 이용되고 있다<sup>24-27)</sup>.

저자 등은 인체 간암 세포를 대상으로 철분이 종양세포의 성장에 미치는 영향을 알아보고, MTT 검사법을 이용한 체외항암제 감수성 검사를 시행하여 DFO가 간암세포의 성장을 억제하는지를 알아보고, 성장을 억제한다면 소화관암에 흔히 사용되는 ADR, 5-FU 및 DDP 등의 항암제와 병합하여 사용할 경우 항암효과에 미치는 영향을 isobologram 분석법을 이용하여 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 재료

#### 1) 대상 세포주

인체 간암세포주로는 PLC/PRF/5(American Type Culture Collection; ATCC, CRL 8024, Alexander cells) 및 Hep G2(ATCC, HB 8065)를, 대조군으로는 태아 폐조직에서 분리된 정상 diploid 세포주인 WI-38(ATCC, CCL 75)을 ATCC (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 세포주의 배양

각 세포주는 ATCC의 추천대로 Eagle's MEM (minimal essential media: JR Scientific & Hazleton Biologic Inc., Lenexa, KS, USA)을 기본배양액으로 하여 56°C에서 30분간 열처리한 10%의 우태아 혈청 (fetal calf serum: Commonwealth Serum Laboratories Ltd., Australia)과 100 IU/ml의 penicillin 및 100 µg/ml의 streptomycin을 첨가한 배양액으로 25 cm<sup>2</sup> plastic flask (Coster, Cambridge, MA, USA)에 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. 우태아 혈청은 종류에 따라 포함된 철분의 양이 다를 수 있으므로 모든 실험에서 동일한 우태아 혈청 (lot no. 46702)을 사용하였으며, 배양액의 신선도를 유지하기 위하여 주 2회 위상차 현미경으로 생육상태를 관

찰하면서 주 1~2회 배양액을 교환하였다.

### 3) 시험 약제

철분제제로는 ferric citrate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 증류수에 용해시킨 후 0.22  $\mu$ m filter( $\mu$ Star, Costar, Cambridge, MA, USA)에 통과시켜 멸균시켰다. DFO(Desferal<sup>®</sup>, Ciba-Geigy, Switzerland)는 사용전 24시간 내에 멸균증류수에 용해한 후 냉장보관하여 사용하였으며, 항암제는 ADR(일동제약), 5-FU(한국로슈) 및 DDP(동아제약)을 냉장보관 후 멸균증류수나 0.9% 생리식염수에 용해하여 사용하였다. 모든 약제들은 우태아 혈청을 함유한 배양액으로 사용시마다 연속 회석하여 실험하였다.

## 2. 연구 방법

### 1) MTT 검사법

실험세포수의 결정 및 약제에 대한 생존율 판정을 위해 MTT 검사법을 이용하였으며, Carmichael 등<sup>21,22)</sup>이 제시한 방법에 준하여 시행하였다. 즉 배양된 각 세포주의 culture flask에 0.25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)(JR Scientific & Hazleton Biologic Inc., Lenexa, KS, USA)를 처리하여 부착된 세포를 분리한 다음 10% 우태아 혈청을 함유한 배양액으로 3회 세척하여 단일세포 부유액을 만들었다. Trypan blue로 염색한 후 hemocytometer로 세포수를 계산한 다음 96 well microtiter plate(Costar, Cambridge, MA, USA)의 각 well에 일정수의 세포를 배양액 180  $\mu$ l에 생리식염수 20  $\mu$ l를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 한 후 일정기간 배양하였다. 약제의 효과 판정을 위해서 세포를 넣은 다음날 실험하고자 하는 여러 농도의 약제를 생리식염수 20  $\mu$ l에 녹여 첨가하여 well 당 200  $\mu$ l가 되게 한 후 일정기간 배양하였다. 생존율 검사시에는 96 well plate를 꺼내어 MTT(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액(2 gm/ml)을 각 well에 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 다시 4시간 동안 배양하였다. 96 well plate를 450 $\times$ g에서 5분간 원심분리한 후 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 30  $\mu$ l가 남을 때까지 상층의 배양액을 제거하였다. 100% dimethyl sulfoxide(DMSO;

Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 각 well에 150  $\mu$ l씩 첨가한 후 formazan 결정이 용해될 때까지 약 10분간 진탕한 다음 multiwell spectrophotometer(Berhinger ELISA Processor II, Germany)를 이용하여 540 nm의 파장에서 색소흡수율(absorbance, optical density)을 측정하였다. 실험군의 생존율은 대조군의 색소흡수율과 비교하여 아래의 공식에 의해 생존율을 계산하였다.

생존율(%) =

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

### 2) 실험 세포수의 결정

지수성장을 보이는 세포수를 구하기 위하여, 각각의 세포주를 96 well plate의 각 column에 well당  $5 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $2 \times 10^4$  및  $5 \times 10^4$  개의 세포를 넣어 배양하였다. PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포는 8일까지 WI-38 세포는 10일까지 배양하여 매일 한 plate씩을 꺼내어 MTT 검사를 시행하였다.

PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포는 각각 5일까지, WI-38 세포는 7일까지 배양할 경우 마지막 날까지 지수적으로 색소흡수율이 증가하는 부분 중 마지막 날의 색소흡수율이 세포수-색소흡수율 상관곡선의 직선부 중 가장 높은 조건이 되는 처음의 well당 세포수를 실험세포수로 정하였다(PLC/PRF/5;  $10^4$  개/well, Hep G2;  $10^4$  개/well, WI-38;  $2 \times 10^4$  개/well).

### 3) Ferric Citrate가 세포 성장에 미치는 효과

배양액내의 철분 농도에 따라 세포 성장율에 차이가 있는지를 알아보기 위하여, 96 well plate를 준비하여 8개의 column의 각 well에 각 세포주의 실험세포수를 배양액 180  $\mu$ l에 섞어서 넣고 ferric citrate를 증류수에 용해시킨 후 filter( $\mu$ Star, 0.22  $\mu$ m, Costar, Cambridge, MA, USA)를 통과시켜 최종농도가 10, 50, 100, 200  $\mu$ g/ml로 되게 회석하여 각각 2개의 column에 첨가하였다. 나머지 4개의 column에는 세포를 넣지 않은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것 및 세포를 넣은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것의 두가지 대조군을 각각 2개의 column에 만들었다. PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포는 5일 동안, WI-38 세포는 7일간

배양하였으며 매일 한 plate씩 MTT 검사를 시행하여 색소흡수율을 구하였고 각 세포주에서 세포를 분주한 날 ferric citrate의 각 농도에 따른 생존율을 100%로 하여 생존율을 계산하였다.

#### 4) Desferoxamine의 세포성장 억제효과

96 well plate를 준비하여 매 plate의 12 column 중 10 column에 PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포를 well 당 각각  $10^4$ 개, WI-38 세포는  $2 \times 10^4$ 개의 세포를 배양액 180  $\mu$ l에 섞어서 넣고 나머지 2 column에는 동일한 세포수를 넣은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것 및 세포를 넣지 않은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것의 두가지 대조군을 만든 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 하였다. DFO를 최종농도가 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 및 500  $\mu$ g/ml이 되게 첨가한 후, PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포는 5일간, WI-38 세포는 7일간 배양하여 MTT 검사를 시행하였으며 농도에 따른 색소흡수율을 측정하여 생존율을 계산하였다. 가로축에 DFO의 대수농도(log concentration)를 세로축에 생존세포의 백분율을 표시하여 생존율-농도 상관관계를 도식화한 다음 직선회귀(linear regression)를 시행하여 얻어진 공식에 의해 50% 세포성장 억제농도(50% inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>)를 산출하였다.

#### 5) Desferoxamine의 간암세포 성장억제 효과에 대한 Ferric Citrate의 상쇄효과

간암세포에서 DFO에 의한 성장 억제효과가 ferric citrate의 동시 첨가에 의해 상쇄되는지를 알아보기 위하여, 96 well plate를 준비하여 매 plate의 12 column 중 10 column에 PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포를 well당 각각  $10^4$ 개씩 배양액 180  $\mu$ l에 섞어서 넣고, 나머지 2 column에는 세포를 넣지 않은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것 및 세포를 넣은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것의 두가지 대조군을 만든 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 하였다. DFO를 최종농도가 각 세포주에서 DFO의 IC<sub>50</sub> [X, (PLC/PRF/5 : 133.8  $\mu$ mol/l, Hep G2 : 52.0  $\mu$ mol/l)]의 0.1배, 1배 및 10배로 되게 10  $\mu$ l의 생리식염수에 녹여서 농도별로 첨가한 후, ferric citrate

를 각 세포주에서 DFO의 IC<sub>50</sub>과 동일한 molar 농도[stoichiometric dose, Y, (PLC/PRF/5 : 133.8  $\mu$ mol/l, Hep G2 : 52.0  $\mu$ mol/l)]를 기준으로 하여 최종농도가 각각 0.1배, 1배 및 10배로 되게한 후 생리식염수 10  $\mu$ l에 녹여 첨가하여 다양한 DFO-ferric citrate 농도 조합을 만들었다(0.1X+0.1Y, 0.1X+Y, 0.1X+10Y, 1X+0.1y, 1X+1Y, 1X+10Y, 10X+0.1Y, 10X+1Y 및 10X+10Y). 나머지 column에는 앞의 3가지 농도의 DFO 및 ferric citrate를 각각 단독으로 첨가하였으며, 5일간 배양한 후 MTT 검사를 시행하여 DFO 및 ferric citrate 모두를 첨가하지 않고 세포만 넣은 것을 기준생존율(100%)로 하여 생존율을 계산하였다.

#### 6) Adrimycin, 5-fluorouracil 및 Cisplatin의 세포성장 억제효과

96 well plate를 준비하여 매 plate의 12 column 중 10 column에 PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포를 well당 각각  $10^4$ 개, WI-38 세포는  $2 \times 10^4$ 개의 세포를 180  $\mu$ l의 배양액에 섞어서 넣고 나머지 2 column에는 동일한 세포수를 넣은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것 및 세포를 넣지 않은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것의 두가지 대조군을 만든 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 하였다. ADR은 최종농도가 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20  $\mu$ g/ml, 5-FU는 최종농도가 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 및 50  $\mu$ g/ml, DDP는 최종농도가 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10  $\mu$ g/ml이 되게 첨가한 후 PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포는 5일간, WI-38 세포는 7일간 배양한 다음 MTT 검사를 시행하여 색소흡수율을 측정하였다. 가로축에 각 항암제의 대수농도를 세로축에 생존세포의 백분율을 표시하여 생존율-농도 상관관계를 도식화한 다음 직선회귀를 시행하여 얻어진 공식에 의해 IC<sub>50</sub>을 산출하였다.

#### 7) Desferoxamine과 Adriamycin, 5-fluorouracil 및 Cisplatin 병합투여 효과

PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포에서 DFO, ADR, 5-FU 및 DDP 각각의 IC<sub>50</sub>을 기준으로 각 약제를 생리식염수 10  $\mu$ l에 녹여서 각 well에 첨가할 때 최종농도가 IC<sub>50</sub>의 4배, 2배, 1배, 0.7배, 0.5배, 0.3

배, 0.2배, 0.1배, 0.07배, 0.05배, 0.02배, 0.01배 및 0배가 되도록 13가지 농도를 만들었다. 96 well plate를 준비하여 매 plate의 12개의 column 중 2개의 column에는 세포를 넣지 않은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것 및 세포를 넣은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것의 두가지 대조군을 만들었으며, 나머지 10개의 column에는 well

당  $10^4$ 개의 세포를 배양액 180  $\mu$ l에 섞어서 넣은 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 하였다. 앞서 준비한 DFO 및 ADR 각각의 13가지 농도를 서로 조합하여 동일조합의 약제를 5개씩의 well에 첨가하여 총 169개의 농도조합을 만들었으며 (Table 1), 같은 방법으로 DFO와 5-FU 조합 및 DFO와 DDP의 조합을 만든 후 5일동안 배

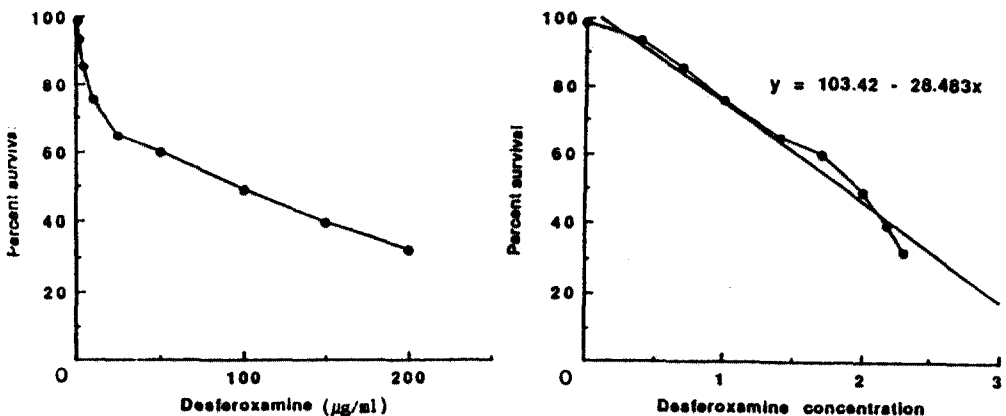
**Table 1. Composition of Dose Combinations of Desferoxamine with Each Chemotherapeutic Agent**

$\frac{B \text{ drug}}{A \text{ drug}}$	4B	2B	1B	0.7B	0.5B	0.3B	0.2B	0.1B	0.07B	0.05B	0.02B	0.01B	0B
4A	4A+4B	4A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4A+0.01B	4A
2A	2A+4B	2A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2A+0.01B	2A
1A	1A+4B	1A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1A+0.01B	1A
0.7A	0.7A+4B	0.7A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.7A+0.01B	0.7A
0.5A	0.5A+4B	0.5A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5A+0.01B	0.5A
0.3A	0.3A+4B	0.3A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.3A+0.01B	0.3A
0.2A	0.2A+4B	0.2A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2A+0.01B	0.2A
0.1A	0.1A+4B	0.1A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1A+0.01B	0.1A
0.07A	0.07A+4B	0.07A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.07A+0.01B	0.07A
0.05A	0.05A+4B	0.05A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05A+0.01B	0.05A
0.02A	0.02A+4B	0.02A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02A+0.01B	0.02A
0.01A	0.01A+4B	0.01A+2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01A+0.01B	0.01A
0A	4B	2B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.01B	0A

A : IC<sub>50</sub> of A drug (DFO)

B : IC<sub>50</sub> of B drug (ADR, 5-FU or DDP)

169 dose combinations of DFO with each chemotherapeutic agent were made to evaluate the combined effect on hepatoma cell lines (PLC/PRF/5 and Hep G2).



**Fig. 1.** Calculation method of IC<sub>50</sub> of each drug.

For example, the percent survival of PLC/PRF/5 cells at different DFO concentrations using linear scale is plotted on the left. And then the IC<sub>50</sub> could be calculated by formula obtained using a Machintosh computer program (Cricket graph) after the replacement of the dose of DFO into log scale (right).

양한 다음 MTT 검사를 시행하여 생존율을 구하였다.

### 3. 자료 분석

#### 1) 50% 세포성장 억제농도의 측정

각 세포주에 여러 약제(DFO, ADR, 5-FU 및 DDP)를 첨가하여 일정기간 동안 배양한 후 MTT 검사로 색소흡수율을 구하여 생존율을 계산하였다. 가로축에는 각 약제의 농도(linear scale)를 세로축에는 생존세포의 백분율을 표시하여 곡선의 생존율-농도 상관관계를 도식화한 다음 직선관계로 나타내기 위해 각 약제의 농도를 대수로 환산한 후 Machintosh computer의 Cricket graph를 이용하여 직선회귀를 시행하여 얻어진 공식에 의해 IC<sub>50</sub>을 산출하였다(Fig. 1).

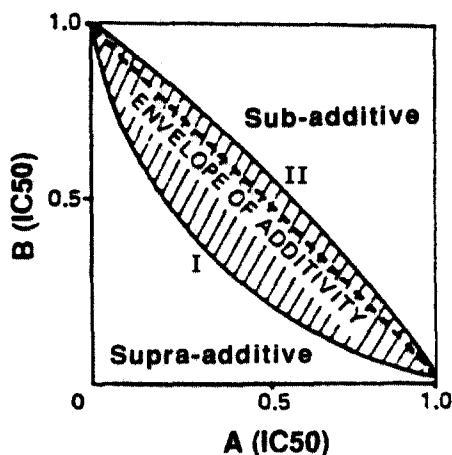


Fig. 2. Terminology for isobologram analysis.

Idealized isobologram illustrating the growth-inhibitory interaction between drugs A and B. The concentration of each drug alone which produces 50% inhibition of growth is set to 1.0. The relative amount of each drug when used in combination produces 50% inhibition of growth is plotted. The curve I illustrates a synergistic interaction between drugs A and B, curve II an antagonistic interaction. The term supra-additive for a response that gives a point to the left of the envelope of additivity. A point to the right of the envelope indicates a sub-additive response which may imply inhibition or antagonism.

#### 2) 항암제 병합투여의 효과판정

DFO와 항암제 병합투여 효과는 Berenbaum<sup>26)</sup>, Steel 및 Peckham<sup>27)</sup>이 제시한 isobologram mode에 의한 분석 방법에 준하여 평가하였다. Isobologram model이란 병합하여 사용된 약제들이 동일한 효과를 나타내는 농도의 조합으로 그려지는 도식으로서, 두 약제간의 상호작용의 두 극단 즉 두 약제가 서로 별개의 독립된 양상으로 작용하는 경우(mode I)와 이와 반대로 상호 의존적으로 작용하게 되는 경우(mode II)에 의해 그려지는 2개의 곡선에 의해 3개의 구역으로 분할된다. 이중 두 곡선으로 둘러 쌓여진 구역은 부가구역(envelope of additivity)이라 불리며 약제의 부가적 병합투여 효과가 이 구역에 속한다. 부가구역으로부터 원점에 근접한 구역 즉 좌하귀에 위치하면 상승구역, 우상귀에 위치하면 길항구역으로 구분하여 실제 병합투여 결과가 등효(isoeffect point; isobole)가 되는 두 약제 농도의 조합을 찾아 위의 그림에 도식하여 어느 구역에 위치하는지에 따라 효과를 판정한다(Fig. 2). 예컨데, 병합투여에서 A, B 두 약제에 대한 세포 생존곡선을 대수적으로 환산하여 도식화하였을 때 Fig. 3과 같다고 가정한다면, A 약제로 Y만큼의 세포를 살상했을 때 S만큼의 살상효과를 얻기 위해서는 B 약제로 X만큼의 세포를 더 살상해야 한다. 이 때 두 약제병합시에 두 약제의 작용기전이 완전히 독립적이거나, 의존적인 경우 이 약제 상호작용의 두 극단을 mode I과 mode II라 부른다. Mode I의 경우에는 세포생존이 A 약제에 의해 감소된 것에 영향을 받지 않으므로 B 약제에 대한 생존곡선 상에서 100% 생존부터 시작해서 D'B만큼 B 약제를 증가시켜야 하며, mode II의 경우는 A 약제에 의한 효과에 따라 좌우되므로 B 약제에 대한 생존곡선 상에서 A 약제에 의해 살상된 나머지를 B 약제가 살상해야 하므로 D''B만큼 B 약제를 증가시켜야 된다(Fig. 3). 이러한 용량의 조합으로 이루어진 이론상의 도식이 isobologram이며, mode I 및 mode II의 두 곡선에 의해 둘러싸인 부분이 부가반응을 나타내는 구역이 된다. 본 실험에서 저자 등은 A 약제와 B 약제의 양을 가로축과 세로축에 표시하고 두가지 약제의 양을 조합하여 mode I과 mode II의 두가지 곡선을 그린 다음 실제 실험치에서 50%의 성장억제

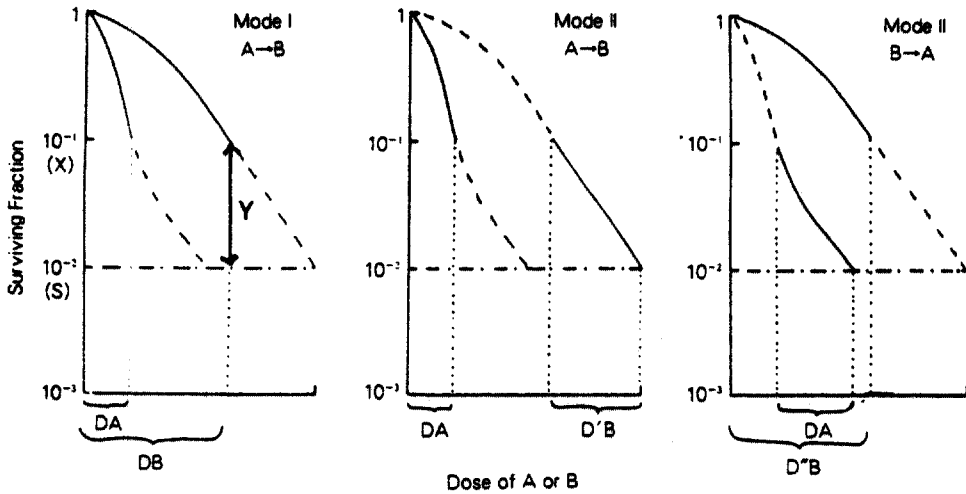


Fig. 3. Method of isobologram analysis. The way in which an envelope of additivity may be calculated for two pairs of cytotoxic agents (A+B) where one of each pair gives a non-linear dose-response curve.

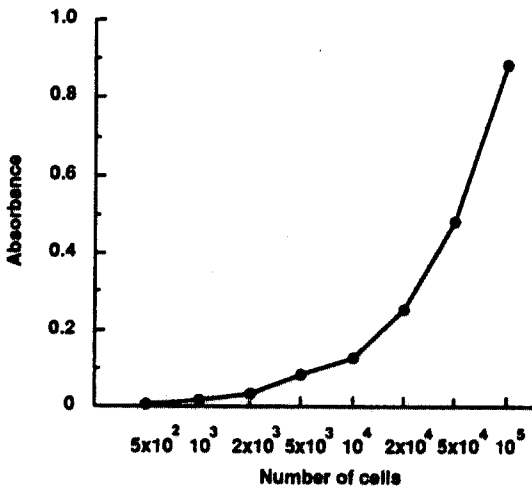


Fig. 4. Correlation of MTT absorbance to number of cells. The increment of the MTT absorbance is proportional to the number of cells of PLC/PRF/5 dispensed in each well of the 96-well plate.

SPSS program을 사용하여 t-test를 시행하였다.

## 결 과

### 1. MTT 흡수율과 생존세포수와의 관계

MTT 흡수율과 생존세포수와의 관계를 알아보기 위하여 PLC/PRF/5 세포의 단일세포 부유액을 trypan blue로 염색한 후 hemocytometer로 세포수를 계산하여 96 well plate에 다양한 수의 세포를 넣은 다음 MTT 색소흡수율을 측정하였던 바, well 당 세포수가 각각 10<sup>2</sup>개, 10<sup>3</sup>개 및 10<sup>5</sup>개를 넣은 경우의 MTT 흡수율은 각각 0.016, 0.124 및 0.884로, well 당 세포수 10<sup>4</sup>개는 10<sup>3</sup>개에 비하여, 10<sup>5</sup>개는 10<sup>4</sup>개에 비하여 색소흡수율이 각각 7.8배 및 7.1배로 증가하여 세포수에 비례하여 MTT 흡수율이 증가하였다(Fig. 4).

### 2. 대상세포주의 증식양상 및 실험세포수의

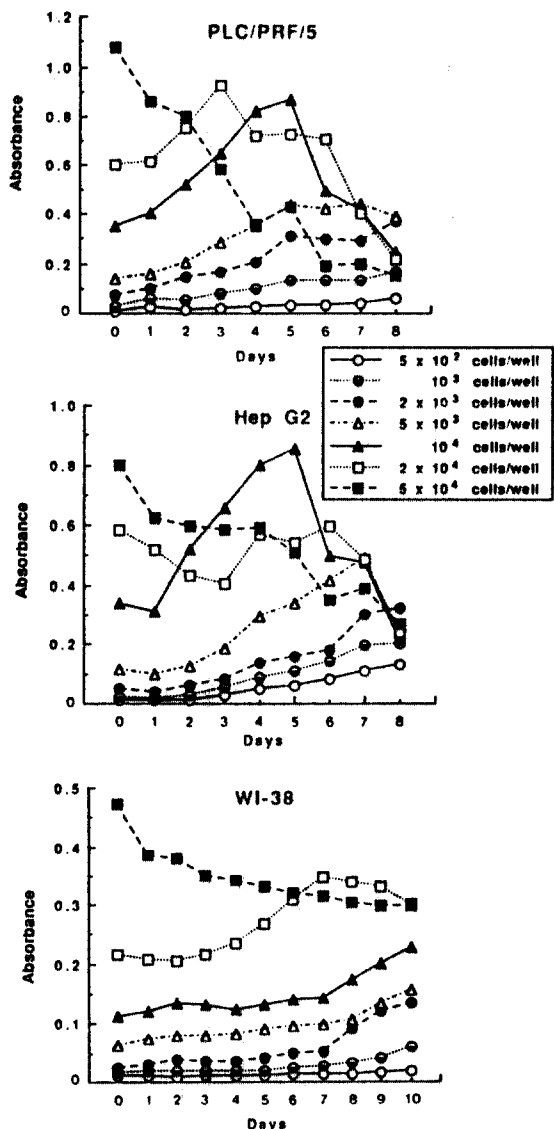
#### 결정

대상세포주를 trypsin 처리로 단일세포 부유액을 만든 후 trypan blue 생체염색으로 세포수를 세어 well당 5×10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 2×10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 2×10<sup>4</sup>, 5×10<sup>4</sup>개의 세포를 96 well plate에서 배양한 후 시간경과에 따른 세포성장곡선을 MTT를 이용한 색소흡수율 측정법으로 관찰하였다. PLC/PRF/5 및 Hep G2 세

효과를 보이는 두 약제의 농도 조합점을 찾아 그림에 도시하여 판정하였다.

### 3) 자료 처리 및 통계학적 분석

각 세포주에서 단일 약제에 대한 생존율, IC<sub>50</sub> 및 병합효과 판정을 위해서는 Machintosh computer의 Excel 및 Cricket graph를 사용하여 산출 및 도식화하였고, 통계적인 처리는 IBM computer의



**Fig. 5.** Growth curves of PLC/PRF/5, Hep G2 and WI-38 cells. The upper growth curves represent PLC/PRF/5, the middle Hep G2 and the lower WI-38. After dispensing the various number of cells of each cell line into 96-well plate, the viability was measured by MTT assay.  $10^4$  cells/well in PLC/PRF/5 and Hep G2,  $2 \times 10^4$  cells/well in WI-38 were used as experimental number of cells which grow the most exponentially and reach the maximal absorbance after 5 days in PLC/PRF/5 and Hep G2 and 7 days in WI-38.

또는 대부분 배양시작 24시간 동안은 세포성장이 미미하였으나, PLC/PRF/5에서는 well당  $5 \times 10^4$ 개, Hep G2에서는  $2 \times 10^4$  및  $5 \times 10^4$ 개의 세포를 넣은 경우를 제외한 모든 경우에서 배양 1일 이후부터 세포성장을 시작하여 5일까지는 비교적 규칙적으로 지수성장(exponential growth)을 하였으며 증식을 멈추는 휴지기를 거쳐 세포수가 감소하였다(Fig. 5). 실험세포수로는 PLC/PRF/5 및 Hep G2 모두 비교적 일정한 지수성장을 하며 배양 5일 후에 최고 흡수율을 보이는 세포수인  $10^4$ 개/well( $5 \times 10^4$ 개/ml)로 정하였다. WI-38은 well당  $5 \times 10^4$ 개를 제외한 모든 군에서 세포성장을 시작하였으나  $10^4$ 개 이하의 세포수에서는 지수성장을 하지 않았으며 배양 10일까지도 계속 0.25 이하의 낮은 MTT 흡수율을 보여서 체외항암제 감수성 검사를 위한 세포수로 적합하지 않았다. WI-38의 실험세포수는 비교적 일정한 지수성장을 하며 배양 7일 후에 최고 흡수율을 보이는  $2 \times 10^4$ 개/well( $10^5$ 개/ml)를 적정수로 결정하였다(Fig. 5).

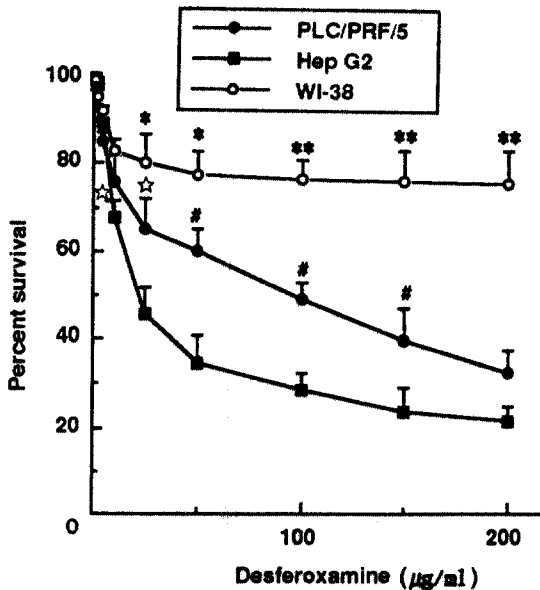
### 3. Ferric Citrate가 세포 성장에 미치는 효과

철분 농도에 따라 세포 성장율에 차이가 있는지를 알아보기 위하여, 각각의 세포주에 0, 10, 50, 100 및  $200 \mu\text{g/ml}$ 의 ferric citrate를 첨가하여 PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포는 5일간 WI-38 세포는 7일간 배양하였다. PLC/PRF/5는 0, 10, 50, 100 및  $200 \mu\text{g/ml}$ 의 ferric citrate를 첨가하였을 때 세포성장율이 각각 265.2%, 310.9%, 304.3%, 274.3% 및 260.2%, Hep G2는 각각 208.8%, 230.9%, 255.1%, 236.6% 및 242.5%로 비록 통계적인 의미는 없었으나 두 세포주 모두 ferric citrate를 첨가하였던 경우가 첨가하지 않았던 경우에 비하여 성장율이 증가하는 경향을 보였다. WI-38은 0, 10, 50, 100 및  $200 \mu\text{g/ml}$ 의 ferric citrate를 첨가하였을 때 7일 후 성장율이 각각 185.3%, 191.7%, 180.5%, 176.0% 및 152.4%로 ferric citrate를 첨가하지 않았던 경우에 비해  $10 \mu\text{g/ml}$ 의 ferric citrate를 첨가했을 경우에만 다소 성장율이 증가하였고 50, 100 및  $200 \mu\text{g/ml}$ 의 ferric citrate를 첨가한 경우에는 모두 성장율이 감소하는 경향을 보였다(Table 2).



**Table 2. Percent Survival after 5 Days Incubation of PLC/PRF/5 and Hep G2 and 7 Days Incubation of WI-38 with Various Doses of Ferric Citrate**

Cell lines	Dose of ferric citrate ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	0	10	50	100	200
PLC/PRF/5	265.2 $\pm$ 5.7	310.9 $\pm$ 26.9	304.3 $\pm$ 39.8	274.3 $\pm$ 18.3	260.2 $\pm$ 29.8
Hep G2	208.8 $\pm$ 17.6	230.9 $\pm$ 29.5	255.1 $\pm$ 18.9	236.6 $\pm$ 36.2	242.5 $\pm$ 21.0
WI-38	185.3 $\pm$ 8.5	191.7 $\pm$ 16.9	180.5 $\pm$ 17.5	176.0 $\pm$ 11.0	152.4 $\pm$ 28.7

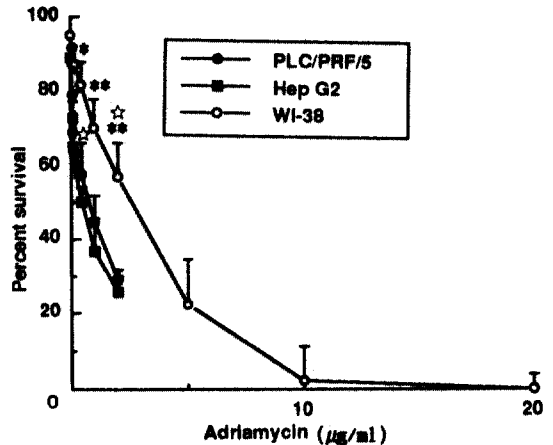


**Fig. 6.** Percent survival of PLC/PRF/5, Hep G2 and WI-38 cells at different concentrations of desferoxamine.

The values represent mean and standard deviation by three experiments determined by MTT assay. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; vs PLC/PRF/5 and Hep G2, \* $p < 0.05$ ; vs Hep G2, ☆  $p < 0.05$ ; vs 0  $\mu\text{g/ml}$ . The inhibition of growth of more than 50% was achieved in PLC/PRF/5 and Hep G2 cells, but WI-38 cells were not inhibited below 74.4% at even 200  $\mu\text{g/ml}$  of DFO.

#### 4. Desferoxamine의 세포성장 억제효과

각각의 세포주에서 배양액에 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 150 및 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 DFO를 첨가하여 세포성장 억제효과를 관찰하였다. PLC/PRF/5에서 1, 10, 50, 100 및 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 DFO 첨가시 세포



**Fig. 7.** Percent survival of PLC/PRF/5, Hep G2 and WI-38 cells at different concentrations of adriamycin.

The values represent mean and standard deviation of three experiments.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; vs PLC/PRF/5 and Hep G2 ☆  $p < 0.05$ ; vs 0  $\mu\text{g/ml}$

의 생존율은 각각 98.7%, 75.8%, 59.9%, 48.9% 및 32.2%이었으며, Hep G2에서는 각각 99.9%, 67.5%, 34.5%, 28.6% 및 21.3%로 두 세포주 모두 DFO를 첨가하지 않았던 경우에 비해서 통계적으로 유의있게 세포 성장이 억제되었다. WI-38은 1, 5, 10 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 DFO 첨가시 세포생존율이 각각 97.2%, 92.5%, 82.8% 및 77.5%로 성장이 억제되는 경향을 보였으나 200  $\mu\text{g/ml}$ 까지 DFO 농도를 증가시켜도 74.4% 이하로 성장억제가 되지 않아서  $\text{IC}_{50}$ 을 구할 수 없었다. 각 세포주의 DFO 농도에 따른 성장억제 효과를 한 그림에 도식화하면 Fig. 7과 같으며, 간암세포인 PLC/PRF/5 및 Hep G2는 정상세포인 WI-38에 비하여, PLC/PRF/5는

Hep G2에 비하여 통계적으로 유의있게 성장이 억제되었다(Fig. 6). PLC/PRF/5의 IC<sub>50</sub>은 75.1 µg/ml로 Hep G2 경우의 29.1 µg/ml 보다 통계적으로 유의있게 높았다(Table 3).

**5. Desferoxamine의 간암세포 성장억제 효과에 대한 Ferric Citrate의 상쇄효과**

PLC/PRF/5 및 Hep G2 각각에 대하여 50% 성장억제 효과를 보이는 DFO의 molar 농도(X)를 기준으로 0.1배, 1배 및 10배의 농도로 만든 후, 각 세포주에서 X 농도와 동일한 ferric citrate의 molar 농도(Y)를 각각 0.1배, 1배 및 10배의 농도로 만들어 서로 조합하여 5일간 배양한 후 MTT 검사를 시행하였으며 두 약제 모두를 첨가하지 않고 세포만 넣은 것을 기준생존율(100%)로 하여 생존율

을 비교하였다. PLC/PRF/5에서 IC<sub>50</sub>의 0.1배, 1배 및 10배의 DFO를 첨가한 경우의 생존율은 각각 88.9%, 46.8% 및 10.7%로 DFO 농도에 비례하여 성장이 억제되었으나 0.1배, 1배 및 10배의 동일한 molar 농도의 ferric citrate를 첨가했을 경우의 생존율은 각각 94.7%, 92.7% 및 91.6%이었다(Table 4). Hep G2 역시 IC<sub>50</sub>의 0.1배, 1배 및 10배의 DFO를 첨가한 경우의 생존율은 각각 89.2%, 48.3% 및 17.1%로 DFO 농도에 비례하여 억제되었으나 0.1배, 1배 및 10배의 동일한 molar 농도의 ferric citrate를 첨가했을 경우에는 각각 95.5%, 101.8% 및 98.3%로(Table 5), DFO에 의한 PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포의 성장억제 효과가 ferric citrate 동시 투여로 상쇄되었다.

**6. Adriamycin, 5-fluorouracil 및 Cisplatin의 세포성장 억제효과**

각각의 세포주에서 다양한 농도의 ADR, 5-FU 및 DDP를 첨가하여 성장억제 효과를 관찰하였던바, PLC/PRF/5, Hep G2 및 WI-38 모두 항암제의 농도를 증가시킴에 따라 성장이 억제되었다. PLC/PRF/5, Hep G2 및 WI-38에서 ADR의 IC<sub>50</sub>은 각각 0.564 µg/ml, 0.351 µg/ml 및 1.228 µg/ml로 Hep G2가 ADR에 가장 민감하였고 PLC/PRF/5 및 Hep G2의 IC<sub>50</sub>은 WI-38에 비하여 통계적으로 유의있게 낮았다(Fig. 7, Table 6). 5-FU의 경우

**Table 3. IC<sub>50</sub> of Desferoxamine on Each Cell Line.**

Cell lines	IC <sub>50</sub> of desferoxamine
PLC/PRF/5	75.1±15.7
Hep G2	29.1± 7.4*
WI-38	Not obtainable

\*p<0.01: vs PLC/PRF/5

The values represent mean and standard deviation of three experiments determined by MTT assay. The growth of WI-38 was not inhibited below 50% at even 200 µg/ml of DFO.

**Table 4. Percent Survival of PLC/PRF/5 Cells after 5 Days Incubation with Various Doses of Desferoxamine and Ferric Citrate.**

Dose of Ferric citrate	Dose of desferoxamine			
	0X	0.1X	1X	10X
	% (Mean±SD)			
0Y	100.0	88.9± 7.6	46.8± 6.4**	10.7±6.9**
0.1Y	105.2± 4.5	94.7± 6.0	57.4± 9.5*	20.2±5.4**
1Y	110.4± 9.5	105.8±11.3	92.7± 5.4*	50.9±7.9**
10Y	87.2±20.4	91.0±17.1	93.4±11.4	91.6±9.5**

X : IC<sub>50</sub> of DFO on PLC/PRF/5 cells (133.8 µmol/l)

Y : Stoichiometric dose of ferric citrate (133.8 µmol/l)

\*p<0.01 ; vs 0X+0Y, \*\*p<0.001 ; vs 0X+0Y

\*p<0.01 ; vs 1X+0Y, \*\*p<0.001 ; vs 10X+0Y

**Table 5. Percent Survival of Hep G2 Cells after 5 Days Incubation with Various Doses of Desferoxamine and Ferric Citrate.**

Dose of Ferric citrate	Dose of desferoxamine			
	0X	0.1X	1X	10X
	% (Mean±SD)			
0Y	100.0	89.2± 7.2	48.3± 9.4**	17.1± 7.5**
0.1Y	103.7±5.2	95.5± 9.1	52.3± 7.9*	29.9± 8.1**
1Y	129.5±3.9	119.7± 9.7	101.8± 8.4*	27.6±14.5**
10Y	108.5±9.4	107.4±10.8	96.3±14.5	98.3± 8.9**

X : IC<sub>50</sub> of DFO on Hep G2 cells (52.0 μmol/l)

Y : Stoichiometric dose of ferric citrate (52.0 μmol/l)

\*p<0.01, \*\*p<0.001 ; vs 0X+0Y

\*p<0.01 ; vs 1X+0Y, \*\*p<0.001 ; vs 10X+0Y

**Table 6. IC<sub>50</sub> of Adriamycin, 5-fluorouracil and Cisplatin on PLC/PRF/5, Hep G2 and WI-38 Cells.**

Cell lines	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		
	Adriamycin	5-fluorouracil	Cisplatin
PLC/PRF/5	0.564±0.158*	7.406±3.869	0.848±0.314**
Hep G2	0.351±0.097**	3.327±1.818	1.972±0.607**
WI-38	1.228±0.345	Not obtainable	4.221±0.741

The values represent mean and standard deviation of three experiments.

\*p<0.05, \*\*p<0.01; vs WI-38

The growth of WI-38 was not inhibited below 50% even though the dose of desferoxamine increased upto 200 μg/ml.

PLC/PRF/5 및 Hep G2의 IC<sub>50</sub>은 각각 7.406 μg/ml 및 3.327 μg/ml로 Hep G2가 PLC/PRF/5보다 민감하였고, WI-38은 50 μg/ml 농도에서도 52.2%가 생존하여 IC<sub>50</sub>을 구할 수 없었으며 PLC/PRF/5 및 Hep G2에 비하여 통계적으로 유의있게 성장이 억제되지 않았다(Fig. 8, Table 6). PLC/PRF/5, Hep G2 및 WI-38에서 DDP의 IC<sub>50</sub>은 각각 0.848 μg/ml, 1.972 μg/ml 및 4.221 μg/ml로서 PLC/PRF/5가 가장 민감하였고 WI-38의 IC<sub>50</sub>은 PLC/PRF/5 및 Hep G2보다 통계적으로 유의있게 높았다(Fig. 9, Table 6).

### 7. Desferoxamine과 Adriamycin, 5-fluorouracil 및 Cisplatin 병합투여 효과

PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포에서 DFO와 ADR, 5-FR 및 DDP의 병합효과를 알아보기 위하여 각

약제의 IC<sub>50</sub>을 기준으로 기준농도의 4배에서 부터 희석하여 13가지의 농도를 만든 후 DFO와 ADR, DFO와 5-FU 및 DDP의 다양한 농도 조합을 만들어 5일 동안 배양하여 병합투여 효과를 관찰하였다.

#### 1) PLC/PRF/5 세포에 대한 병합투여 효과

DFO와 ADR의 병합투여 결과 4개의 isobole을 얻을 수 있었는데, 이중 3개(75.0%)는 부가구역에 1개(25.0%)는 길항구역에 위치하였고 상승구역에 위치한 isobole은 없었다. DFO와 5-FU 병합에서는 9개의 isobole 중 6개(66.7%)가 상승구역에, 3개(33.3%)는 부가구역에 위치하였으며 길항구역에 위치한 isobole은 없었다. DFO와 DDP 병합에서는 5개의 isobole 중 1개(20.0%)는 부가구역에 4개(80.0%)는 길항구역에 위치하였으며 상승구역에 위치한 경우는 없었다(Fig. 10).

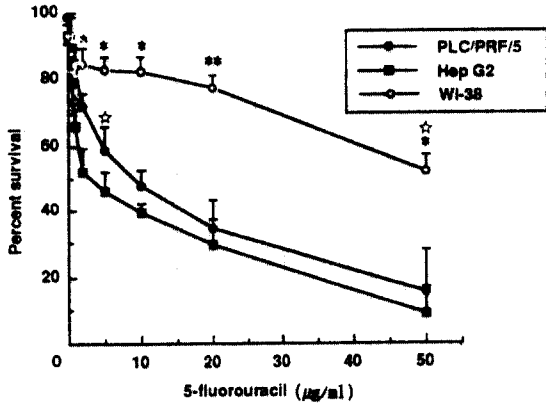


Fig. 8. Percent survival of PLC/PRF/5, Hep G2 and WI-38 cells at different concentrations of 5-fluorouracil.

The values represent mean and standard deviation of three experiments.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; vs PLC/PRF/5 and Hep G2  
 ☆ $p < 0.05$ ; vs 0  $\mu\text{g/ml}$

The growth of WI-38 cells could not be inhibited more than 50% at 50  $\mu\text{g/ml}$  of 5-fluorouracil.

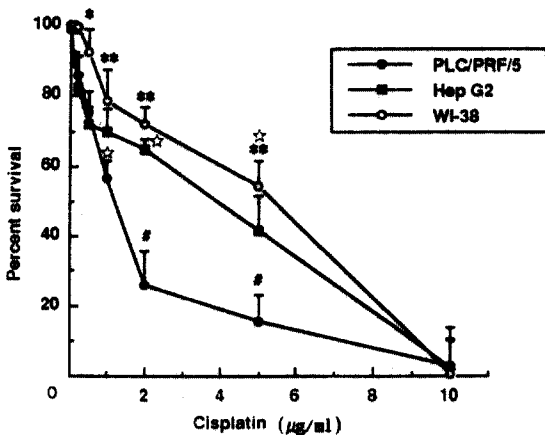


Fig. 9. Percent survival of PLC/PRF/5, Hep G2 and WI-38 cells at different concentrations of cisplatin.

The values represent mean and standard deviation of three experiments.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; vs PLC/PRF/5 and Hep G2  
 ☆ $p < 0.05$ ; vs Hep G2, ☆ $p < 0.05$ ; vs 0  $\mu\text{g/ml}$

## 2) Hep G2 세포에 대한 병합투여 효과

DFO와 ADR의 병합에서는 7개의 isobole 중 1개 (14.3%)는 상승구역에, 6개 (85.7%)는 부가구역에

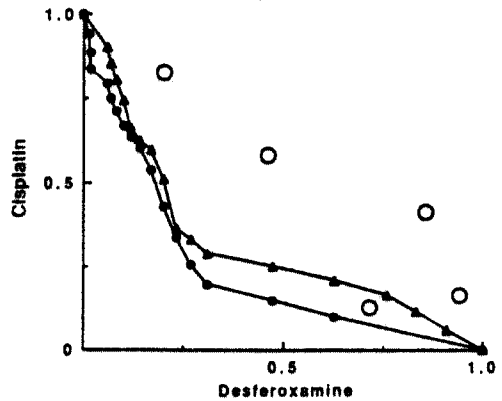
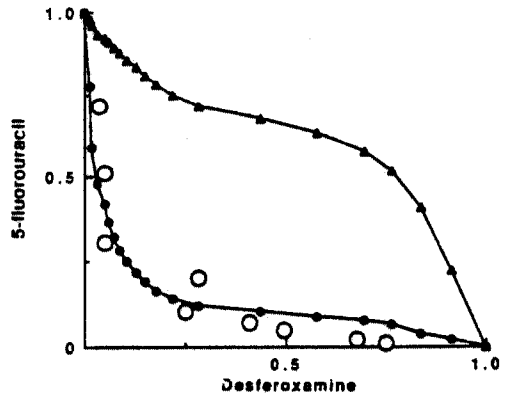
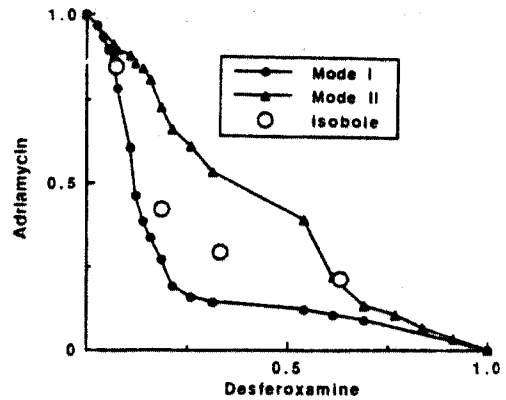


Fig. 10. Isobolograms of desferoxamine-adriamycin, desferoxamine-5-fluorouracil and desferoxamine-cisplatin combinations in PLC/PRF/5 cells.

The upper represents the isobologram of desferoxamine-adriamycin, the middle desferoxamine-5-fluorouracil and the lower desferoxamine-cisplatin combinations. The synergistic effects were observed in combinations of desferoxamine-5-fluorouracil in PLC/PRF/5 cells.

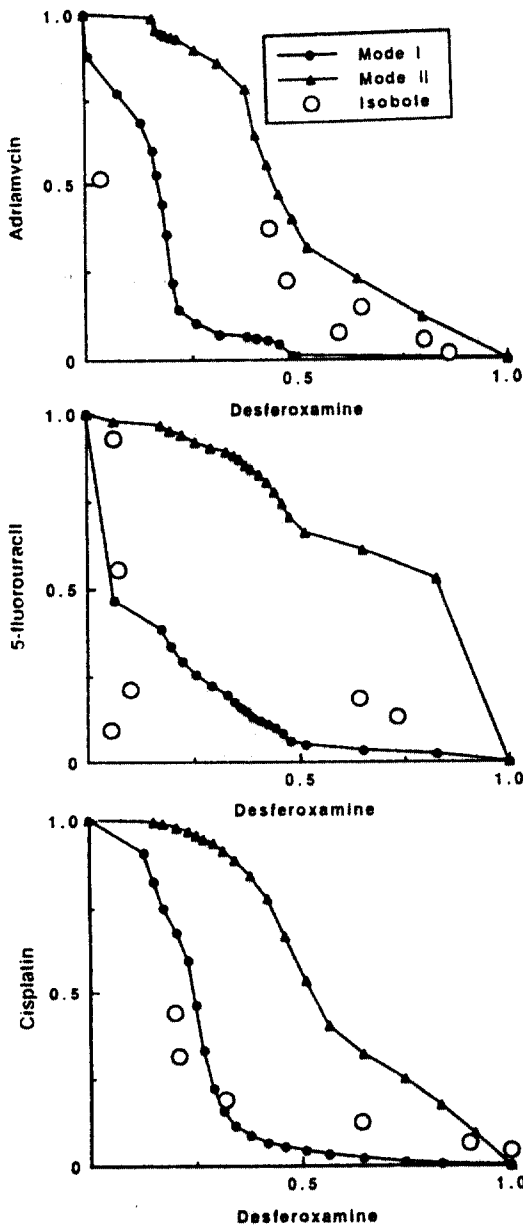


Fig. 11. Isobolograms of desferoxamine-adriamycin, desferoxamine-5-fluorouracil and desferoxamine-cisplatin combinations in Hep G2 cells.

The upper represents the isobologram of desferoxamine-adriamycin, the middle desferoxamine-5-fluorouracil and the lower desferoxamine-cisplatin combination. The synergistic effects were observed in all three combinations of desferoxamine with chemotherapeutic agents.

위치하였으며 길항구역에 위치한 isobole은 없었다. DFO와 5-FU 병합에서는 6개의 isobole 중 2개 (33.3%)가 상승구역에 4개(66.7%)는 부가구역에 위치하였으며 길항구역에 위치한 경우는 없었다. DFO와 DDP 병합에서는 6개의 isobole 중 2개 (33.3%)는 상승구역에 3개(50.0%)는 부가구역에 위치하였으며 1개(16.7%)가 길항구역에 위치하였다 (Fig. 11).

## 고 안

철분은 암세포를 포함한 모든 세포의 성장 및 분열에 필수적인 영양소이며 electron transport protein, iron flavoprotein, hydroperoxidase, oxygenase 및 ribonucleotide reductase 등과 같은 세포의 성장 및 증식에 필수적인 단백질이 활성화되기 위해서 반드시 필요하다. 그러나 철분이 인체에 과잉 축적되었을 때에는 각종 암의 발생 빈도가 증가하거나 암세포의 성장이 촉진된다고 알려져 있다<sup>14,16)</sup>. Blumberg 등<sup>28)</sup>은 B형 간염 바이러스의 만성 보균자에서 원발성 간암의 발생이 철분의 과잉축적과 관련이 있다는 가설을 제시하였으며, Stevens 등<sup>29)</sup>은 대만인 검진대상자 21,513예를 대상으로 추적관찰하여 원발성 간암이 70예 그외의 악성종양이 122예에서 발생하였는데, 간암환자에서 암이 발생하기 이전에 측정된 혈청 ferritin치가 정상대조군 및 간암 이외의 다른 악성종양 환자에 비하여 의미있게 높았다고 하여 철분과잉과 간암 발생의 관련성을 주장하였다. 간암 이외에도 Hodgkin병, 신경아세포종, 유방암 및 백혈병 환자에서 체내 저장철의 양을 반영하는 혈청 ferritin치가 증가하며 ferritin치가 높을수록 예후가 불량하다는 보고들은 악성종양의 발생 및 예후에 철분이 관여함을 시사하고 있다<sup>30-32)</sup>.

철분과잉이 암을 유발하는 기전은 아직 확실하지 않으나, 철분과잉에 의해 지방의 과산화가 초래되며 이로 인해 형성된 지방의 과산화물이 간세포의 핵 또는 미토콘드리아의 DNA를 직접 손상시키거나<sup>33-36)</sup>, 세포막의 투과도 및 효소의 활성도가 변화되어 간세포 손상이 초래되며, 이와같은 현상이 반복적으로 일어날 때 간섬유화 및 간경변증의 단계를 거쳐 간세포암이 발생한다고 알려져 있다<sup>37)</sup>.

한편, 백서에 대장암, 간암 및 유방암 세포를 이식한 후 체중 kg당 5mg 이하로 철분 공급을 제한한 경우가 kg당 312mg 이상으로 철분을 충분히 공급하였던 경우에 비해서 종양의 성장이 둔화되었으며<sup>18)</sup>, 인체 간암세포인 PLC/PRF/5 세포를 시험관 내에서 배양하여 6주 후 세포의 무게를 측정하였던 바, 철분을 공급하였던 경우의 세포무게는 14.7gm 인데 반해 철분을 공급하지 않았던 경우는 9.6gm 이었다고 하여<sup>38)</sup>, 악성종양에서 철분의 과잉공급시 종양의 성장이 촉진되며 철분 결핍시 종양의 성장이 억제됨은 악성종양의 치료로 DFO와 같이 철분을 chelation시키는 약제의 임상적 이용 가능성을 시사한다고 하였다.

저자 등도 여러가지 농도의 ferric citrate를 첨가한 후 성장율을 비교하였던 바 PLC/PRF/5 및 Hep G2의 간암세포에서는 철분을 첨가한 군이 철분을 첨가하지 않았던 군에 비해서 성장율이 증가하는 경향을 보였으나 WI-38 세포에서는 성장율이 다소 감소하였다. 이는 종양세포와 같이 세포 증식이 활발할수록 DNA 합성을 위한 철분의 요구량이 증가하며, 증가된 요구량에 충분하게 철분을 공급하면 종양세포가 적절히 증식하게 되기 때문일 것으로 추측되며, 실제 임상에서 악성종양 환자의 혼한 소견인 빈혈을 치료하기 위한 철분제제의 투여나 수술 등이 오히려 악성종양의 성장을 촉진시킬 가능성이 있다고 생각된다. Robbins 및 Pederson<sup>39)</sup>도 HeLa 세포에서 분열중간기에는 철분이 대부분 핵소체에 위치하나 유사분열기에는 염색체로 이동되며, DFO를 투여시 DNA 합성이 억제되었으나 정상세포에서는 DNA 합성 억제효과가 없었음을 관찰하여 철분이 세포분열에 필수적인 역할을 하며 세포의 증식이 활발할수록 철분의 요구량이 증가한다고 하였다.

일찌기 Fernandez-Pol<sup>40)</sup>이 시험관내에서 배양된 백서의 정상 신장세포에 철분을 chelation하는 약제인 picolinic acid를 투여하였을 때 세포의 성장이 억제되었다고 하여 철분을 chelation시키는 약제에 의한 세포성장 억제효과를 처음으로 보고한 이래, 시험관내에서 phytohaemagglutinin으로 자극한 임파구<sup>20,41)</sup>, 신경아세포종<sup>42)</sup>, 백혈병<sup>43-45)</sup> 및 원발성간암 등<sup>38)</sup>에서 DFO의 성장 억제작용이 보고되었다.

DFO(Desferal®)는 Streptomyces pilosus에 의해

생성되는 hydroxamic acid 유도체로 deferoxamine 또는 desferrioxamine으로도 불리워지며  $C_{26}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_3SO_3H$ 의 구조식을 갖고 있다. DFO는 3가 철이온(ferric ion,  $Fe^{+++}$ ) 또는 3가 알루미늄이온( $Al^{+++}$ )과 등가적으로(equimolar) 결합하여 복합체인 ferrioxamine 또는 aluminioxamine을 형성한 후 소변 또는 대변으로 배설되는데, 유리철과 ferritin 또는 hemosiderin에 결합된 철분과는 chelation하나 transferrin 및 혈색소에 결합된 철분은 제거하지 못하며 2가 금속이온들과의 결합력은 약하다고 알려져 있다.

종양세포에 대한 DFO의 성장 억제기전은 아직 확실하지 않으나, 일반적으로 DNA 합성 과정의 첫 단계에 작용하는 효소인 ribonucleotide reductase를 억제하기 때문이라고 알려져 있다. Ribonucleotide reductase는 활성화되기 위해서 반드시 철분이 필요하며, ribonucleoside diphosphates를 deoxyribonucleoside diphosphates로 환원시키는 작용을 하여 세포주기 중 G1기가 S기로 진행되기 위한 필수적인 효소이다<sup>20,41,43,46)</sup>. Becton 및 Roberts<sup>44)</sup>는 인체의 백혈병 세포주인 HL-60, HEL 및 U-937 세포에 DFO를 첨가하면 그 농도 및 노출시간에 비례하여 DNA 합성이 억제되었으나 RNA 및 단백질 합성에는 영향을 주지 않는 것으로 보아 DFO의 항암효과는 DNA 합성 억제에 의한다고 하였다. 또한 Hoffbrand 등<sup>41)</sup>은 phytohaemagglutinin으로 자극한 임파구에 DFO를 투여하였을 때 deoxyadenosine triphosphate치가 감소하나, deoxythymidine triphosphate, deoxycytidine triphosphate 및 deoxyguanosine triphosphate 등의 다른 3종의 deoxyribonucleoside triphosphates치는 증가하며, 임파구의 ribonucleotide reductase 및 thymidine kinase의 생성이 억제되고 세포주기중 초기 S기에서 세포성장이 정지되었다고 하였고, 이와같은 변화는 ribonucleotide reductase 억제제로 이미 알려진 항암제인 hydroxyurea에서 관찰되는 변화와 동일한 현상으로 DFO의 항암작용이 ribonucleotide reductase의 억제에 기인하기 때문이라고 하였다. 그러나 Yung 등<sup>45)</sup>은 백혈병 세포주인 HL-60에 DFO를 투여하면 그 용량 및 노출시간에 비례하여 인산화단백질인 protein B23이 핵소체에서 핵질로 이동되며 동

시에 DNA 및 RNA의 합성이 모두 억제되었다고 하며, 철분을 추가하였을 때 핵질로 이동되었던 protein B23이 다시 핵소체로 이동되며 DFO의 성장 억제효과가 상쇄되었다고 하였다. 또한 HL-60 세포의 핵소체를 분리하여 라이보솜전 라이보핵단백 입자(pre-rRNP, preribosomal ribonucleoprotein particle)를 추출하였던 바 pre-rRNP는 protein B23과 같이 위치하고 있었으며 DFO를 처리한 세포의 핵소체에서는 pre-rRNP가 관찰되지 않았다고 하였다. 이와같은 현상은 actinomycin D<sup>45)</sup> 및 ADR<sup>47)</sup>에서 관찰되는 양상과 같은 소견으로 DFO가 핵소체에서 rRNA의 합성을 억제하며 결과적으로 protein B23가 핵소체내의 결합부위를 잃게 되어 핵질로 이동하게 된다고 하여 다소 상이한 기전을 제시하였다. 철분을 chelation하는 약제의 종류는 매우 다양한데, Ganeshaguru 등<sup>46)</sup>은 시험관내에서 배양된 입자에서 철분을 chelation하는 여러 약제에 따른 DNA 합성 억제효과를 비교한 결과, DFO와 같은 hydroxamic acid계 약물 및 benzoic acid계 약물 모두 DNA 합성 억제효과가 있었으나, ribonucleotide reductase 억제효과는 hydroxamic acid계 약물에서만 관찰되었다고 하여 약제의 종류에 따라 세포내 작용기전이 서로 다르며 이는 세포내의 서로 상이한 철분 pool에 작용하기 때문이라고 하였다.

한편 항암약물에 대한 감수성검사는 시험관내 감수성 검사법과 누두 마우스 등을 이용한 생체내 감수성 검사법으로 구분할 수 있는데, 생체내 검사는 약제의 직접적인 항종양효과와 약물 역동학적인 정보뿐만 아니라 생존율에 대한 평가가 가능하다는 장점이 있으나, 인체와는 다른 숙주이며 시간과 노력을 요하고 제한된 효과를 관찰하기에는 효과적이지 못하므로 시험관내 검사가 주로 이용되고 있다<sup>48)</sup>. 시험관내 감수성 검사법은 집락형성 검사와 비집락형성 검사로 구분되는데, 집락형성 검사는 분석기간이 긴 점과 세포응집에 의한 artifact 등이 문제시되었다. 최근에는 색소배제법, 색소섭취법, <sup>51</sup>Cr release assay, <sup>3</sup>H-thymidine 또는 <sup>3</sup>H-uridine 섭취검사법, 형광색소법, sulforhodamine B(SRB) 검사법 및 MTT 검사법 등의 여러 비집락형성 검사법이 개발되어 널리 이용되고 있다<sup>21-23,50-53)</sup>. 이중 MTT

검사법은 살아있는 세포의 cytochrome b 및 c 부위에 있는 미토콘드리아의 탈수소효소인 succinate-dehydrogenase가 MTT환을 분절시킴으로서 노란색의 MTT염이 분광광도법(spectrophotometry)으로 측정 가능한 보라색의 formazan 결정으로 환원되는 특성을 이용한 방법으로 죽은 세포에서는 일어나지 않고 산 세포에만 선택적으로 반응이 일어나는 데에 근거를 두고 있다. MTT 검사법은 동위원소가 필요하지 않고 재현성이 뛰어나며 집락형성검사와 상관도가 높고 96 well plate를 이용하여 multi-well 분광광도계로 측정하기 때문에 다량의 검체를 신속하게 처리할 수 있으므로 많은 양의 자료를 분석하기에 매우 효율적인 방법이다<sup>21-23)</sup>. 그러나 세포가 배양기 벽에 부착하여 성장하는 경우에는 MTT 흡수율이 비교적 일정하여 적절한 검사법으로 인정받고 있으나, 배양액에 부유하여 성장하는 세포에서는 적합하지 않다고 알려져 있는데<sup>21)</sup>, 저자 등도 배양기 벽에 붙어서 성장하는 세포주를 이용하였다.

한편 체외 항암제 감수성 검사를 위한 약제의 선택과 적절한 농도 및 노출시간의 결정은 동일한 조직 소견을 가진 종양 및 동일한 환자의 종양에서도 반응이 다양하기 때문에 어렵다. 일반적으로 최고혈중 농도의 0.1~0.01배의 농도로 1시간 노출시킨 후 배양하여 50~70%의 생존율을 저하시킬 때 감수성이 있는 것으로 보고하고 있으나, 단일농도의 약물을 사용할 경우에는 용량-반응관계를 알기 어려워 다양한 농도의 약물로 감수성 검사를 시행하는 것이 바람직하며<sup>54)</sup>, 저자 등도 다양한 농도의 약제를 사용하여 성장억제 효과 및 IC<sub>50</sub>을 구하였다. 체외 항암제 감수성 검사시의 약물 투여방법에는 단시간 동안 노출시키는 방법과 연속적으로 노출시키는 방법이 있는데<sup>55,56)</sup>, 본 연구에서는 실험방법이 간편하고 약물의 세척과정에서 일어날 수 있는 종양세포의 유실을 방지할 수 있는 연속노출방법을 택하였다.

본 연구에서 MTT 검사법을 이용하여 DFO의 세포성장 억제효과를 관찰하였던 바, 간암세포인 PLC/PRF/5 및 Hep G2 모두 DFO 농도에 비례하여 세포의 성장이 억제되었으며, DFO 200 µg/ml을 투여시 세포 생존율은 양군에서 각각 32.2% 및 21.3%이었고, IC<sub>50</sub>은 각각 75.1±15.7 µg/ml 및 29.1±6.4 µg/ml로 PLC/PRF/5의 경우가 Hep G2

에 비하여 높았다. 그러나 WI-38은 DFO를 200  $\mu$ g/ml까지 투여하여도 성장이 74.4% 이하로 억제되지 않았다. 이와같이 종양세포에서는 DFO에 의해 성장이 억제되나 정상세포에서는 성장억제 효과가 미미함은 종양세포와 같이 세포의 증식이 활발할수록 ribonucleotide reductase 등과 같은 효소의 활성화를 위한 철분의 요구량이 증가하며 이에 따라 DFO에 의한 DNA 합성 억제효과가 증가하기 때문으로 생각되며, DFO가 항암약물로서 이용될 수 있는 가능성을 제시한다고 생각된다.

Blatt 및 Stitely<sup>42)</sup>는 시험관내에서 DFO와 DFO의 철분결합물인 ferrioxamine을 배양액에 첨가한 후 신경아세포종 세포를 배양한 결과, DFO는 농도에 비례하여 종양세포의 성장을 억제하였으나 ferrioxamine은 성장 억제효과가 없음을 관찰하여 DFO의 항종양효과는 철분의 chelating 능력에 의한다고 하였다. 본 연구에서도 DFO 및 ferric citrate를 다양한 농도로 조합하여 간암세포를 배양한 결과, PLC/PRF/5 및 Hep G2 세포 모두 DFO 농도에 비례하여 성장이 억제되었으나, 동일한 molar 농도의 ferric citrate를 첨가시에는 DFO에 의한 성장억제 효과가 상쇄되었다. 이는 DFO의 성장억제 작용이  $Fe^{+++}$ 의 복합체인 ferrioxamine에 의하지 않고 철분의 chelation에 의한을 시사한다고 생각된다.

요즘에는 악성종양의 치료로 약제에 대한 내성을 최소화하고 항암효과를 증대시키기 위해 항암제 병합요법이 널리 이용되고 있다. 그러나 약제-종양-개체 사이에 작용하는 여러 요인들 때문에, 가장 이상적인 효과를 얻을 수 있는 약제를 선택하거나 투여 방법을 결정하기는 쉽지 않으며, 병합요법의 대부분은 단지 경험적인 방법에 의존하여 사용되고 있다. 간암에서도 ADR, 5-FU, DDP, mitomycin C, VP-16 및 CCNU 등의 여러 약제들의 병합요법이 시도되고 있으나 그 반응율은 매우 낮다. 5-FU를 포함한 약제 조합이 다소 효과가 좋다고 보고되고 있으나<sup>57,58)</sup>, 일반적으로 반응율은 20% 정도에 불과한 실정이어서<sup>6-9)</sup>, 항암약물요법의 성적을 향상시킬 수 있는 새로운 약제 또는 새로운 병합요법의 개발을 위해서 많은 연구가 진행되고 있다.

두가지 이상 약제의 병합요법의 효과를 판정하기

위해서는 시험관내 실험 및 동물실험이 이용되고 있는데, 동물실험은 생체의 반응이 다양하고 실험방법의 제한성 때문에 어려우나 시험관내 실험은 약제-종양간의 상호작용을 연구하기에 적합한 방법으로 알려져 있다<sup>48,59)</sup>. 시험관내 실험을 통한 항암제의 병합효과 판정법은 상승, 길항 또는 부가 효과의 정의 및 분석방법이 일정하지 않아서 보고자마다 각자의 기준에 의해서 평가해왔다. 병합요법의 효과판정 방법으로 크게 두가지가 이용되고 있는데, 각 약제의 효과를 산술적으로 합하여 병합효과가 각각의 약제의 효과를 더한 것보다 크거나 혹은 작으면 상승 혹은 길항작용이 있는 것으로 간주하는 산술적인 방법인 additivity model과, 사용된 약제들의 동일한 효과를 나타내는 농도의 조합에 의해 그려지는 곡선 중 서로 별개의 독립된 양상으로 작용할 경우와 이와 반대로 서로 의존적으로 작용할 경우에 의해 그려지는 두 곡선에 의해 구분되는 구역을 이용하는 기하학적 방법인 isobologram model이 있다. 약제의 용량-반응 관계가 직선일 경우에는 산술적인 방법인 additivity model을 적용할 수 있으나 생물학적 제제의 용량-반응관계는 대부분 비직선인 S자형이므로 isobologram model을 이용한 기하학적 분석이 바람직한데 그동안 isobologram 분석법은 자료의 처리를 위하여 많은 수의 실험결과가 필요하여 널리 이용되지 못하였으나 최근에 들어서 MTT 검사법의 개발과 더불어 점차 널리 이용되고 있다<sup>24-27)</sup>. Isobologram이란 함께 사용된 약제들의 동일한 효과를 나타내는 농도 조합으로 그려지는 graph로서 두 약제간의 상호작용의 두 극단, 즉 두 약제가 전혀 별개의 독립된 양상으로 작용하는 경우(mode I)와 이와 반대로 서로 의존적으로 작용하는 경우(mode II)로 그려지는 곡선에 의해 3개의 구역으로 분할한 후, 실제 두 약제를 병합한 결과를 도식화하여 3개의 구역 중 어디에 위치하는지에 따라 병합효과를 판정하는 방법이다. 저자 등도 두 가지 약제가 각각 독립적으로 또는 의존적으로 작용할 경우의 두 곡선을 그린 후 실제 병합투여의 효과가 등효가 되는 점을 찾아 그림에 도시하여 두가지 곡선으로 둘러싸인 부가구역내에 위치할 경우에는 부가작용으로, 부가구역의 좌하귀에 위치하면 상승작용, 우상귀에 위치하면 길항작용으로 판정하였다.



DFO와 항암제 병합요법의 효과에 대해서는 임상적으로 급성림프아구성 백혈병 및 신경아세포종 환자에서 시도한 보고가 있다<sup>43,60</sup>. Estrov 등<sup>43</sup>은 vincristine, prednisone, daunomycin, L-asparaginase 및 cytosine-arabioside(Ara-C)의 병합투여로 반응이 없었던 생후 6주된 급성림프아구성 백혈병 환자에게 DFO 및 Ara-C를 병합투여한 결과 관해가 일어났다고 하였으며, 최근 Donfrancesco 등<sup>60</sup>은 신경아세포종 환자 13예에서 etoposide, cyclophosphamide, carboplatin 및 thiotepa의 기존의 병합요법에 DFO를 추가로 투여하였던 바, 2주기 치료 후에 12예에서 반응을 보였는데 이중 4예는 완전관해를, 8예는 부분적인 관해가 관찰되었다고 보고하였다. 그러나 아직까지 시험관내 배양된 악성종양세포에서 DFO와 항암제 병합요법의 효과에 대한 보고는 없었다.

저자 등은 DFO와의 병합효과를 알아보기 위한 항암제로 ADR, 5-FU 및 DDP를 사용하였다. ADR은 *Streptomyces peucetius*로부터 분리된 항생제로서 이중나선구조의 DNA내에서 intercalation을 유발하는 것이 가장 중요한 약리기전으로 알려져 있다. 그외에도 2가 양이온의 chelation, coenzyme Q의 억제, 지방의 과산화에 의한 유리산소의 형성 및 세포막 Na, K-ATPase의 억제 등의 효과가 있으며 세포주기에 특이성은 없다. 5-FU는 대사되어 5-fluoro-2'-deoxy-5'-mono-phosphate(5-FdUMP)로 전환된 후 thymidylate synthase와 강하게 결합하여 deoxythymidine triphosphate(dTTP) 형성을 억제하는 것이 주된 항암기전인데, 세포주기에 특이성을 갖고 있는 약제로 S기에 있는 세포들에 대한 독성이 강하다. 한편, DDP는 중금속인 백금을 포함하고 있으며 일종의 alkylating agent와 같은 작용을 하여 DNA내 interstrand, intrastrand 및 단백질의 cross-linking을 일으켜 DNA 연쇄를 절단시키는데 세포주기 특이성은 없다.

본 연구에서 병합투여 결과, PLC/PRF/5의 경우 DFO와 5-FU 병합에서 9개의 isobole 모두 상승 또는 부가구역에 위치하였는데 이중 6개(66.7%)가 상승구역에 위치하여 매우 높은 상승효과가 관찰되었다. Hep G2에서는 DFO와 5-FU 병합에서 6개의 isobole 모두 상승 또는 부가구역에 위치하였으며

이중 2개(33.3%)가 상승구역에 있었고, DFO와 DDP 병합에서는 6개의 isobole 중 5개가 상승 또는 부가구역에 있었는데 이중 2개(33.3%)가 상승구역에 위치하였다. 두 세포주 모두에서 DFO와 5-FU 병합에 상승효과가 관찰되었는데, 이는 5-FU가 S기에 대한 세포주기 특이성을 갖고 있고 DFO 역시 초기 S기를 억제하므로 두 약제가 동시에 S기에 특이적으로 작용하기 때문으로 추측된다. Estrov 등<sup>43</sup>은 DFO와 Ara-C를 병합투여하여 관해를 얻을 수 있었으며, Tobey 및 Crissman<sup>61</sup>도 동일한 세포주기에 있는 종양세포에 hydroxyurea 및 Ara-C의 병합투여 결과 상승효과가 있었으며 세포의 성장이 S기 및 G1기 사이에서 정지되어 있었다고 하였다. 위의 병합약제들 중 DFO와 hydroxyurea 모두 ribonucleotide reductase를 억제하는 동일한 항암기전을 갖고 있고 세포주기 중 S기에 특이적으로 작용하는 약제이며, 또한 본 연구에서 사용하였던 5-FU가 Ara-C와 같이 antimetabolite인 pyrimidine 유도체로 S 주기에 특이성을 가진 약제임을 고려할 때 이들 약제의 병합에서 관찰된 상승효과가 서로 유사한 기전에 의한 것으로 추측된다. 한편, 5-FU의 항암효과는 thymidylate synthase를 억제하는 것이 주된 기전인데 DFO는 thymidine kinase의 억제 효과를 갖고 있으므로<sup>44</sup>, 이들 두 약제의 병합투여 시 DNA 합성과정 중 동일한 경로를 각각 다른 기전으로 억제하게 되어 상승작용이 있을 것으로도 추측되나 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

시험관내 병합투여시 상승작용이 있더라도 인체에서는 항암제의 흡수, 대사과정 및 독성 등의 여러 요인들이 작용할 수 있으므로 임상적으로 반드시 동일한 효과를 얻을 수는 없으며, 시험관내 항암제의 병합투여 효과는 세포내의 반응을 반영하나 임상투여 효과를 그대로 반영하지는 못한다. 실제로 임상적으로는 뚜렷한 상승효과가 입증되었으나 시험관내 실험에서는 병합효과를 관찰할 수 없는 경우도 있으며 이와 반대의 경우도 얼마든지 가능하다<sup>62,63</sup>. 그러나, 이러한 시험관내 실험결과는 임상시험의 항암제 병합치료의 한 지침이 될 수 있음은 분명하며, 본 연구에서 시험관내에서 배양된 간암세포에서 상승효과가 관찰되었음은 앞으로 간암의 항암약물치료로 DFO 및 다른 항암제와의 병합요법이 임상적으

로도 이용될 수 있는 가능성을 제시한다고 생각된다.

## 요 약

**목적:** 원발성간암은 예후가 매우 불량한 악성종양의 하나로 항암약물요법 등의 보존적 치료에 의존하게 되는 경우가 대부분이나 그 반응율은 20% 정도에 불과하여, 항암약물요법 성적을 향상시킬 수 있는 새로운 약제의 개발 또는 새로운 병합요법이 요망되고 있다. 최근 철분과 몇몇 악성종양의 발생 및 성장과의 관련성과 철분을 chelation시키는 약제인 desferoxamine(DFO)의 종양성장 억제효과에 대한 보고들은 본 약제의 항암제로의 이용 가능성을 시사하며 타항암약제와의 병합효과가 기대되나 아직까지 이에 대한 보고는 없었다.

저자 등은 인체 간암세포를 대상으로 DFO가 간암세포의 성장을 억제하는지를 알아보고, 성장을 억제한다면 소화관암에 흔히 사용되는 adriamycin(ADR), 5-fluorouracil(5-FU) 및 cisplatin(DDP) 등의 항암제와 병합하여 사용할 때 항암효과에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

**방법:** 인체 간암세포주인 PLC/PRF/5 및 Hep G2와 대조군으로 정상 diploid 세포주인 WI-38을 대상으로 하였다. 철분이 시험관내 종양세포의 성장에 미치는 영향을 알아보고, MTT 분석법을 이용한 체외항암제 감수성검사를 시행하여 DFO의 성장억제효과를 측정하였다. 또한 DFO와 항암약제들과의 병합효과는 isobologram 분석법을 이용하여 병합효과를 판정하였다.

### 결과:

1) 다양한 농도의 ferric citrate를 첨가한 결과, PLC/PRF/5 및 Hep G2에서는 ferric citrate를 첨가한 경우가 첨가하지 않았던 경우에 비하여 성장율이 증가하는 경향을 보였으나, WI-38에서는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 ferric citrate를 첨가했을 경우에만 다소 세포 성장율이 증가하였고, 50, 100 및 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 성장율이 감소하였다.

2) PLC/PRF/5 및 Hep G2에서는 DFO 농도에 비례하여 성장이 억제되었으며,  $\text{IC}_{50}$ 은 각각 75.1  $\mu\text{g/ml}$  및 29.1  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. WI-38에서는 200  $\mu\text{g/ml}$ 까지 증량하여도 74.4% 이하로 성장이 억제되지 않아서  $\text{IC}_{50}$ 을 얻을 수 없었다.

3) 간암세포주에서 DFO에 의한 성장억제 효과가 ferric citrate 동시 투여에 의해 상쇄되는지를 알아보기 위하여 DFO와 동일한 molar 농도의 ferric citrate를 첨가하였을 때 DFO에 의한 성장억제효과가 PLC/PRF/5 및 Hep G2 모두에서 통계적으로 의미있게 상쇄되었다.

4) ADR, 5-FU 및 DDP를 첨가하여 성장억제 효과를 관찰하였던 바, ADR의  $\text{IC}_{50}$ 은 PLC/PRF/5, Hep G2 및 WI-38에서 각각 0.564  $\mu\text{g/ml}$ , 0.351  $\mu\text{g/ml}$  및 1.228  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 5-FU의  $\text{IC}_{50}$ 은 PLC/PRF/5에서 7.406  $\mu\text{g/ml}$ , Hep G2에서 3.327  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 WI-38에서는 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 5-FU를 투여하여도 52.2%가 생존하였으며, DDP의  $\text{IC}_{50}$ 은 각각 0.848  $\mu\text{g/ml}$ , 1.972  $\mu\text{g/ml}$  및 4.221  $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

5) 간암세포주에서 isobologram 분석법을 이용하여 DFO와 ADR, 5-FU 또는 DDP를 병합투여한 결과는 다음과 같았다.

가. PLC/PRF/5 세포주에서 DFO와 5-FU를 병합투여한 경우에는 9개의 isobole 중 6개(66.7%)가 상승구역에 위치하였으나, DFO와 ADR, DFO와 DDP를 병합하였을 때에는 상승효과를 관찰할 수 없었다.

나. Hep G2 세포주에서 DFO와 ADR의 병합시에는 7개의 isobole 중 1개(14.3%)가 상승구역에 위치하였으며, DFO와 5-FU, DFO와 DDP의 병합시에는 모두 6개의 isobole 중 2개(33.3%)가 상승구역에 위치하였다.

다. WI-38 세포주에서 DFO와 5-FU, DFO와 ADR, DFO와 DDP의 병합시에는 모두 6개의 isobole 중 2개(33.3%)가 상승구역에 위치하였다.

**결론:** 철분은 시험관내 간암세포주의 성장을 촉진시키고 DFO는 종양세포의 성장을 억제시키나 정상 세포에서의 성장억제 효과는 미미하였으며, 간암세포에서 DFO에 의한 성장억제 효과가 철분의 동시 투여에 의해서 상쇄되는 것으로 미루어보아 DFO의 항종양효과가 철분의 chelation에 기인하기 때문으로 생각된다. DFO와 항암제의 병합투여 결과 간암세포에서 상승효과가 관찰되었음은 앞으로 간암의 항암약물치료로 DFO와 다른 항암제의 병합치료의 임상적 응용이 기대된다.

— Abstract —

**Effect of Desferoxamine on the Growth  
of Human Hepatoma Cells  
Cultured in Vitro**

Si Young Song, M.D., Won Ho Kim, M.D.

Mi Yun Chon, Kwang Hyub Han, M.D.

Jae Bock Chung, M.D., Chae Yoon Chon, M.D.

Young Myung Moon, M.D., Jin Kyung Kang, M.D.

In Suh Park, M.D., Heung Jai Choi, M.D.

Jung Koo Youn, M.D.\*, Byong Ro Kim, M.D.\*\*  
and Kyong Sik Lee, M.D.\*\*

*Department of Internal Medicine and Institute of  
Gastroenterology, Department of Microbiology\*,  
Department of Surgery\*\*, Yonsei University,  
College of Medicine, Seoul, Korea*

**Objectives:** It has been known that excessive iron promote the growth of cancer cells and suggested that iron oversupply in cancer patients may enhance tumor growth and adversely affect cancer therapy and that desferoxamine (DFO) as a iron chelating agent may have a place in anticancer agents, which acts as a potent inhibitor of DNA synthesis via inhibition of the ribonucleotide reductase. However there have been no reports on the combined effect of DFO with other chemotherapeutics in vitro.

This study was done to answer the questions: "Does DFO inhibit the growth of cultured hepatoma cells?" and "Does the combination of DFO and chemotherapeutic agents have a synergistic effect on inhibition of tumor growth?"

**Methods:** Using PLC/PRF/5 and Hep G2 cells as hepatoma cells and normal diploid cells of WI-38 as control, the MTT assay was performed for evaluation of the cytotoxicity and an isobologram method to analyze the combined effects of DFO and other chemotherapeutic agents.

**Results:**

1) The hepatoma cells grew faster in an iron-enriched medium than in the medium without additional iron supplementation but the normal diploid cells of WI-38 did not.

2) The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) on PLC/PRF/5 and Hep G2 cells were 75.1 and 29.1 µg/ml, respectively. But the growth of WI-38 was not inhibited

below 74.4% with even 200 µg/ml of DFO.

3) On both hepatoma cells, the growth inhibitory effects of DFO were reversed with simultaneous administration of stoichiometric doses of ferric citrate.

4) Adriamycin (ADR), 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin (DDP) inhibited the growth of all 3 cell lines, but larger doses were required to inhibit the WI-38 to obtain the same effect.

5) When DFO was combined with chemotherapeutic agents, a marked synergistic effect was observed with the combination of DFO and 5-FU on PLC/PRF/5 cells. The synergistic effect was also noted in Hep G2 cells with all three combinations of DFO-ADR, DFO-5-FU and DFO-DDP.

**Conclusion:** Iron oversupply may enhance the hepatoma growth and this should be taken into consideration treating patients with hepatoma. And the antitumor effect of DFO and its synergistic effect with other chemotherapeutic agents may suggest that iron chelator like the DFO may be a useful treatment for patients with hepatoma in conjunction with other anti-cancer drugs.

**Key Words:** Hepatoma, Desferoxamine, Chemotherapy, Synergism

**REFERENCES**

- 1) 노원식, 이해선, 임용의, 백승진, 강진경, 최홍재 : 악성종양의 통계적 고찰. 대한소화기병학회잡지 4: 33, 1972
- 2) 성진실, 이연구, 서창욱, 노준규, 유형식, 노재경, 김병수, 한광협, 이상인, 최홍재 : 원발성 간암의 온열 및 방사선 병용요법. 대한암학회지 21:117, 1989
- 3) 한광협, 한승희, 전재운, 노재경, 이상인, 강진경, 박인서, 최홍재, 유형식, 이종태 : I-131-lipiodol의 간내주입과 간동맥색전술에 의한 원발성간암 치료효과. 대한소화기병학회잡지 22:573, 1990
- 4) Masters A, Steger AC, Bown SG: Role of interstitial therapy in the treatment of liver cancer. Br J Surg 78: 518, 1991
- 5) Shiina S, Tagawa K, Unuma T, Takanashi R, Yoshiura K, Yutaka K, Hata Y, Yasuro N, Shiratori Y, Terano A, Sugimoti T: Percutaneous ethanol injection therapy for hepatocellular carcinoma. A histopathologic study. Cancer 68:1524, 1991
- 6) Baker LH, Saiki JH, Jones SE, Hewlett JS, Brownlee RW, Stephens RL, Vaitkevicius VK:

- Adriamycin and 5-fluorouracil in the treatment of advanced hepatoma: A Southwest Oncology Group Study. Cancer Treat Rep 61:1595, 1977*
- 7) Chlebowski RT, Chan KK, Tong MJ, Weiner JM, Ryden VM, Bateman JR: *Adriamycin and methyl-CCNU combination therapy in hepatocellular carcinoma; Clinical and pharmacokinetic aspects. Cancer 48:1088, 1981*
  - 8) Al-Idrissi HY, Ibrahim EM, Satir AA, Satti MB, Al-Kasem A, Al-Qurain A: *Primary hepatocellular carcinoma in the eastern province of Saudi Arabia: Treatment with combination chemotherapy using 5-fluorouracil, adriamycin and mitomycin-C. Hepato-gastroenterol 32:8, 1985*
  - 9) Ravry MJR, Omura GA, Bartolucci AA, Einhorn L, Kramer B, Davila E: *Phase II evaluation of cisplatin in advanced hepatocellular carcinoma and cholangio-carcinoma: A Southeastern Cancer Study Group trial. Cancer Treat Rep 70:311, 1986*
  - 10) Goldberg L, Martin LE, Smith JP: *Iron overloading phenomena in animals. Toxicol Appl Pharmacol 2: 683, 1960*
  - 11) Ludin PM: *The carcinogenic action of complex iron preparations. Br J Cancer 15:838, 1961*
  - 12) Magnusson G, Flodh H, Malmfors T: *Oncological study in rat of Ferastral, an iron-poly-(sorbitol-glyconic acid) complex after intramuscular administration. Scand J Haematol (Suppl 32):87, 1977*
  - 13) Finch SC, Finch CA: *Idiopathic hemochromatosis, an iron storage disease. A. Iron metabolism in hemochromatosis. Medicine 34:381 1955*
  - 14) Bomford A, Williams R: *Long-term results of venisection therapy in idiopathic hemochromatosis. Q J Med 45:611, 1976*
  - 15) Ammann RW, Müller E, Banský J, Schüller G, Häcki WH: *High incidence of extrahepatic carcinomas in idiopathic hemochromatosis. Scand J Gastroenterol 15:733, 1980*
  - 16) Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G: *Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. N Engl J Med 313:1256, 1985*
  - 17) Bergeron RJ, Streiff RR, Elliot GT: *Influence of iron on in vivo proliferation and lethality of L1210 cells. J Nutr 115:369, 1985*
  - 18) Hann HL, Stahlhut MW, Blumberg BS: *Iron nutrition and tumor growth; Decreased tumor growth in iron deficient mice. Cancer Res 48:4168, 1988*
  - 19) Robbins E, Fant J, Norton W: *Intracellular iron-binding macromolecules in HeLa cells. Proc Nat Acad Sci USA 69:3708, 1972*
  - 20) Lederman HM, Cohen A, Lee JWW, Freedman MH, Golfand EW: *Desferoxamine; A reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. Blood 64:748, 1984*
  - 21) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 47:936, 1987*
  - 22) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; Assessment of radiosensitivity. Cancer Res 47:943, 1987*
  - 23) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott FJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR: *Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Res 48:589, 1988*
  - 24) Drewinko B, Loo TL, Brown B, Gottlieb JA, Freireich EJ: *Combination chemotherapy in vitro with adriamycin. Observations of additive, antagonistic, and synergistic effects when used in two-drug combinations on cultured human lymphoma cells. Cancer Biochem Biophys 1:187, 1976*
  - 25) Berenbaum MC: *Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. Clin Exp Immunol 28:1, 1977*
  - 26) Berenbaum MC: *A method for testing for synergy with any number of agents. J Infect Dis 137:122, 1978*
  - 27) Steel GG, Peckham MJ: *Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. Int J Radiation Oncology Biol Phys 5:85, 1979*
  - 28) Blumberg BS, Lustbader ED, Whitford PL: *Changes in serum iron levels due to infection with hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA 78:3222, 1981*
  - 29) Stevens RG, Beasley RP, Blumberg BS: *Iron-binding proteins and risk of cancer in Taiwan. J Natl Cancer Inst 76:605, 1986*
  - 30) Hazard JT, Drysdale JW: *Ferritinemia in cancer. Nature 265:755, 1977*
  - 31) Hann HL, Levy HM, Evans AE: *Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma. Cancer Res 40: 1411, 1980*
  - 32) Melia WM, Bullock S, Johnson PJ, Williams R:

- Serum ferritin in hepatocellular carcinoma; A comparison with alphafetoprotein. Cancer* 51:2112, 1983
- 33) Shires TK: *Iron-induced DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei. Biochem J* 205:321, 1982
- 34) Ames BN: *Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative diseases. Science* 221:1256, 1983
- 35) Halliwell B, Gutteridge JM: *Review article: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J* 219:1, 1984
- 36) Hruszkewycz AM: *Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. Biochem Biophys Res Commun* 153:191, 1988
- 37) Bacon BR, Britton RS: *The pathology of hepatic iron overload: A free radical-mediated process? Hepatology* 11:127, 1990
- 38) Hann HL, Stahlhut MW, Hann CL: *Effect of iron and desferoxamine on cell growth and in vitro ferritin synthesis in human hepatoma cell lines. Hepatology* 11:566, 1990
- 39) Robbins E, Pederson T: *Iron, its intracellular localization and possible role in cell division. Proc Natl Acad Sci USA* 66:1244, 1970
- 40) Fernandez-Pol JA: *Iron; Possible cause of the G1 arrest induced in NRK cells by picolinic acid. Biochem Biophys Res Commun* 78:136, 1977
- 41) Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton JW, Tattersall MHN: *Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. Br J Haematology* 33:517, 1976
- 42) Blatt J, Stitely S: *Antineuroblastoma activity of desferoxamine in Human cell lines. Cancer Res* 47:1749, 1987
- 43) Estrov Z, Tawa A, Wang XH, Dube ID, Sulh H, Cohen A, Gelfand EW, Freedman MH: *In vitro and in vivo effects of desferoxamine in neonatal acute leukemia. Blood* 69:757, 1987
- 44) Becton DL, Roberts B: *Antileukemic effects of deferoxamine on human myeloid leukemia cell lines. Cancer Research* 49:4809, 1989
- 45) Yung BYM, Yang YH, Bor AMS: *Nucleolar protein B23 translocation after deferoxamine treatment in a human leukemia cell line. Int J Cancer* 48:779, 1991
- 46) Brown NC, Eliasson R, Reichard P, Thelander L: *Spectrum and iron content of protein B2 from ribonucleoside diphosphate reductase. Eur J Biochem* 9:512, 1969
- 47) Chan PK, Aldrich MB, Yung BYM: *Studies of nucleolar protein B23 translocation after doxorubicin treatment in tumor cells. Cancer Res* 47:3798, 1987
- 48) Ganeshaguru K, Hoffbrand AV, Grady RW, Cerami A: *Effect of various iron chelating agents on DNA synthesis in human cells. Biochem Pharmacol* 29:1275, 1980
- 49) Momparler RL: *In vitro systems for evaluation of combination chemotherapy. Pharmac Ther* 8:21, 1980
- 50) Black MM, Speer FD: *Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue. J Natl Cancer Inst* 14:1147, 1954
- 51) Mosmann T: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods* 65:55, 1983
- 52) Finlay GJ, Wilson WR, Bagulery BC: *Comparison of in vitro activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukemia cell lines. Eur J Cancer Clin Oncol* 22:655, 1986
- 53) Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR: *Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst* 82:1113, 1990
- 54) 고은희, 심우남, 이원영, 고유용, 박용준, 김주향, 노재경, 김병수: 암세포의 항암제 감수성 검정에 있어서 누드마우스의 효용. 연세의대논문집 20:15, 1987
- 55) Ajani JA, Baker FL, Spitzer G, Kelly A, Brock W, Tomasovic B, Singletary SE, McMutrey M, Plager C: *Comparison between clinical response and in vitro drug sensitivity of primary human tumors in the adhesive tumor cell culture system. J Clin Oncol* 5:1912, 1987
- 56) 노재경: 단기 배양된 위선암 세포군의 각종 항암제에 대한 체외 세포독성에 관한 연구. 연세의대 학위논문집 제2 학기: 91, 1989
- 57) Buroker TR: *Mitomycin-C alone and in combination with infused 5-FU to treatment of disseminated gastrointestinal carcinomas. Med Pediatr Oncol* 4:35, 1978
- 58) Umsawasdi T, Chainuvatti T, Hitannant S, Nilprabhassorn P, Viranuvatti V: *Combination chemotherapy with 5-fluorouracil (NSC-19893), methotrexate (NSC-740), and prednisolone (NSC-9900) (FAP protocol) for hepatoma. Proc AACR and ASCO* 19:193, 1978

- 59) 김홍태, 박재갑, 김진복, 박성희, 김노경 : 인체 위 암세포주에 대한 5-fluorouracil과 재조합 Interferon-gamma의 병합투여 효과에 관한 연구. 대한암학회지 22:458, 1990
- 60) Donfrancesco A, Deb G, Dominici C, Angioni A, Caniglia M, DeSio L, Fidani P, Amici A, Helson L: *Deferoxamine, cyclophosphamide, etoposide, carboplatin, and thiotepa (D-CECaT): A new cytoreductive chelation-chemotherapy regimen in patients with advanced neuroblastoma. Am J Clin Oncol 15:319, 1992*
- 61) Tobey RA, Crissman HA: *Use of flow microfluorometry in detailed analysis of effects of chemical agents on cell cycle progression. Cancer Res 32:2726, 1972*
- 62) Tsai CM, Gazdar AF, Venzon DJ: *Lack of in vitro synergy between etoposide and cis-diammine-dichloroplatinum (II). Cancer Res 49:2390, 1989*
- 63) Park JG, Kramer BS, Lai SL, et al: *Chemosensitivity pattern and expression of human multidrug resistance-associated MDR1 gene by human gastric and colorectal carcinoma cell lines. J Natl Cancer Inst 82:193, 1990*
-