

Subrenal Capsule Assay를 이용한 흰쥐와 Zucker 비만쥐에 폐암세포주 이식의 효과

이동석, 김송명, 김종인, 변정훈

고신대학교 의과대학 흉부외과학교실

The Effects of Lung Cancer Cell Line in Spague Dowley Rats and Zucker's Obese Rats Using Subrenal Capsule Assay.

Dong Suk Lee, Song Myung Kim, Jong In Kim, Jung Hoon Byun

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kosin University College of Medicine

Abstract

The effects of lung cancer cell line in Spague Dowley rats and Zucker's obese rats using subrenal capsule assay.

Background / Purpose : Lung cancer is well known as one of the high malignant cancer. So far many clinical trials of multimodality treatment consisted of chemotherapy, radiotherapy and surgery were performed, but the results showed quite difference according to the authors and the 5-year survival rate is still dismal. Presently the subrenal capsule assay is regarded as the best method to assess anticancer chemosensitivity and it's importance is increasing gradually. Recently, obesity due to overnutrition and underexercise has been increased. In this study, we evaluated of the tumor growth and the differences of cancer chemosensitivity after human lung cancer cell implantation between Sprague Dowley rats and Zucker obese rats. **Material and Method :** Human lung cancer cells(SW-900 G IV) were cultured on the RPMI 1640 media which contains fetal cow serum and fibrin clot which contains 107 cancer cells($2 \times 2 \times 2\text{mm}^3$). Those cultured cells were implanted to a S.D rats were implanted to a S.D. rats and a Zucker obese rats. Group I and group II were S.D rats and group III and group IV were Zucker obese rats. From the first day to sixth day of implantation, cyclosporin-A(80mg/kg) was given subcutaneously for immunosuppression. Group I and III were given for normal saline, group III and group IV were given for NIC (Navelbine 10mg/kg, Ifosfamide 30mg/kg, Cis-Platinum 1mg/kg) chemotherapy for 6 days after tumor cell implantation. Body weight and blood glucose level were measured before and after the implantation. Implanted tumor size and it's histological findings were evaluated and the results of each groups were compared. **Result :** Because of the NIC chemotherapy, group II showed loss of the body weight, but group IV was not affected by the chemotherapy relatively and the body weight increased slowly by rat's age. The blood glucose level of each groups were within normal range. But its level of group II was less than group I by 23mg%, but group III and IV have similar glucose level which means those two groups were not affected much by the cancer chemotherapy. The growth of implanted cancer cells in Zucker obese rats was slow than in S.D. rats. The cancer cell growth of S.D rats was not inhibited by chemotherapy, but chemotherapy influenced to the cancer cell growth in Zucker obese rats. In the histologic findings, malignant potency was relatively high in group I and II, but low in group III and IV. Apoptosis were found in group II, IV. All of groups revealed mild inflammation and fibroblasts were observed in group I, III. **Conclusion :** This study demonstrates that subrenal capsule assay can be used to determine the response of human lung cancer cell to various combinations of chemotherapeutic agents. And the subrenal capsule assay can be done for the chemosensitivity test for lung cancer cells in short time. In the Zucker obese rats, we certified that metabolic state related to obesity influenced to human lung cancer cell growth.

Key words : subrenal capsule assay, Zucker obese rats, lung cancer cell(SW-900), cancer chemosensitivity test

교신저자 : 김 송 명
고신대학교 복음병원 흉부외과학교실
부산시 서구 암남동 34번지
Tel : (051) 990-6236
E-mail : smkimmd@kosinmed.or.kr

서 론

세계적으로 폐암은 암 발생의 12.8%를 점유하면서 암으로 인한 전체 사망 중에서는 17.8%를 차지하고 있다.¹⁾ 이와 같이 이미 잘 알려진 여러 각종 종양 중에서도 악성도가 강한 암종으로 생존율이나 예후가 불량하여 수술적절제, 항암방사선치료나 항암화학치료에도 5년 생존율이 만족할만한 결과를 보이고 있지 않는 실정이다. 폐암은 일차적으로 흡연이 가장 중요한 원인으로 인정되고 있으나 금연 단독만으로는 암 발생을 완전히 해결할 수 없으므로 그로 인하여 폐암 사망률을 감소시키려는 각종의 다른 연구 개념들이 생기게 되었으며 그러한 개념들은 조기 발견 전략에서부터 암에 의한 각종 임상적 처치들까지 다양한 방향의 연구 목적에 이용되고 있다.²⁾

폐암세포들로부터 새로운 생물학적 치료(biologically based therapy)가 고안되고 있으며, 특히 성장, 증식과 전이 형태, 세포주기 조절제(cell-cycle regulators)와 신호전달(signal transduction) 등에 이르기까지 임상치료결과들을 향상시키고 있다.³⁾ 그 예로서는 상피발생학적으로 변형된 암 발생 유전자(epigenetically altered oncogene)와 종양억제유전자(tumor suppressor oncogene)등이 있다. 위의 것들에 대한 연구들은 복잡하면서도 현재까지 서로 상반된 결과들이 많이 발표되고 있는 실정이며 개인적으로도 성적의 차이를 심하게 보이고 있다.⁴⁾

폐암에 이환된 환자는 진단 즉시 TNM병기와 그 병기에 따른 수술적 절제와 함께 항암 화학 치료나 방사선 조사 치료가 이루어진다. 그러나 화학치료의 방법은 계속적으로 발전하고 있으나 실제로 임상에서는 치료효과가 개인과 병변에 따라 큰 차이가 있어 그 정확한 원인이나 기전에 대해서는 현재까지 잘 밝혀져 있지 않는 실정이다.

신피막하 분석법(Subrenal capsule assay, SRCA)은 1978년 Bogden^{5,6)}에 의해 처음 개발된 방법으로 종양조직에 대한 항암제 감수성을 판별하는 실험방법으로서 인체 종양주나 조직의 절편을 nude mouse의 신피막하에 이식하여 항암제 투여를 계속하고 일정시간 후에 종양의 크기를 측정하여 항암제 감수성을 생체 내에서 판별할 수 있는 빠르고 신뢰성이 있는 screening법이다.

실험용으로 사용되는 많은 쥐 중에서 비만과 관련되어 후천적으로 쉽게 제2형 당뇨병으로 진행될 수 있는 종류로

서 Zucker(fa/fa) 비만쥐⁸⁾가 있다. Zucker 비만쥐는 고지혈증, 고콜레스테롤혈증과 고인슐린혈증이 있으며 지방세포의 과증식에 의해 비후된 지방조직을 나타내고 있으나, 고인슐린혈증으로 인하여 혈당치는 정상범위인 것을 특징으로 하고 있다.⁸⁻¹³⁾

고지혈증, 고콜레스테롤혈증과 비만증은 주로 심혈관계 질환과의 연관성이 다수의 연구들에 의해 입증되었으며, 또 비만이 암의 발생이나 성장을 증가시킨다는 사실이 일부 연구에서 밝혀지고 있다. 그러나 비만과 폐암의 연관성에 대한 연구에서는 서로 상반되는 결과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.^{32,33)}

본 실험에서는 S.D. 쥐와 Zucker 비만쥐 사이에 인체폐암세포주를 이식한 후 폐암세포주의 성장이나 항암치료시의 폐암세포주의 성장과 항암제 감수성을 비교 평가하였다.

재료 및 방법

i) 실험동물 및 실험군

본 실험에는 Sprague Dowley계의 암컷 흰쥐(이하 S.D. 쥐)를 사용하였으며, 동시에 유전적으로 Zucker(fa/fa) 암컷 비만쥐(이하 Zucker 비만쥐)를⁸⁾ 사용하였다.

실험 I군과 II군은 주령이 21-23주 사이에 있는 개체수가 각각 10마리의 S.D. 쥐군으로 I군은 생리식염액을 투여하였으며 II군은 NIC(Navelbine[®] 10mg/kg, Ifosfamide 30mg/kg, Cis-Platinum 1mg/kg) 항암치료를 시행하였다. 실험 III군과 IV군은 개체수가 각각 7마리의 주령이 16-17주 사이에 있는 Zucker 비만쥐군으로 III군은 생리식염액을 투여하였고 IV군은 NIC 항암치료를 시행하였다. 모든 실험군에게 이식 1일부터 6일간 면역억제를 위해 cyclosporin-A (80mg/kg)를 피하투여하였다 (Table 1, 2).

Table 1. Experimental groups and number.

	Group	Number of rats	Age(weeks)
G I	Control group	10	21 - 23
G II	NIC group	10	21 - 23
G III	Zucker control group	7	16 - 17
G IV	Zucker NIC group	7	16 - 17

NIC : Navelbine, Ifosfamide, Cis-Platinum

Table 2 'NIC' Chemotherapeutic Drugs and Doses in Subrenal Capsule Assay

	Chemotherapeutic regimen	Dose	Administered route
N	Vinorelbine tartrate (Navelbine®)	10mg/kg	S.C
I	Ifosfamide (Holoxan®)	30mg/kg	S.C
C	Cis-Platinum (Placis®)	1mg/kg	S.C
CSA	Cyclosporin (Cypol®)	1mg/kg	S.C

ii) 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 폐암세포주(SW-900, G IV)는 인체에 유해한 폐암중에서 악성도가 매우 높은 편평세포암종으로 한국세포주은행 (Korean cell line bank, KCLB)에서 동결된 상태의 세포암종과 배양액에서 성장시킨 세포부유액으로 2종류의 SW-900 G IV를 구입하여 사용하였다.

동결 세포주를 고체탄산가스통에서 꺼낸 후 37-40℃의 수조에 넣어 40-60초간 가운으로 녹였다. 이어 상온의 clean bench 내에서 70% 알코올액 속에 넣어 시험관 전체를 깨끗하게 소독을 실시하였다.

폐암세포주(SW-900)의 배양은 세포부유액을 원심분리기(Hitachi 05PR-22 Japan) 1,000RPM에 3분간 원심분리하여 배양용 용기에 넣어 37℃ 5% CO₂가 공급되는 배양기(Co₂ incubator, Jauan, France)에서 배양하였다. 이때 사용한 배양액은 RPMI 1640 배양액(Leibovitz L-15 medium)을 사용하였다.¹⁴⁾

iii) Fibrin clot 제조

Fibrin clot은 Fingert^{15,16)}가 소개한 방법으로 제조하였다. 배양 플라스틱 용기표면에 유착하여 단층으로 증식 중인 폐암세포주(SW-900) 세포를 phosphate 완충생리식염액(phosphate buffer saline, PBS)으로 세척하고 trypsin-EDTA (Gibco, USA) 용액으로 처리하여 단세포 현탁액으로 만든 후, trypsin-EDTA와 세포부스러기를 제거키 위해 우태혈청이 없는 완전 배양액(세척배지)을 첨가한 후 1,000rpm으로 5분간 3회 원심분리를 하고 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다. 세포수 10⁷개를 얻기 위해 microcentrifuge tube에 있는 세포 pellet에 15μl의 human fibrinogen(F-4129, 20mg/ml, Sigma USA)을 첨가하고 세포가 골고루 분산되게끔 가볍게 혼합한 후, 다음 8μl의 human thrombin (T-6884 20units/ml, Sigma USA)을 위와 같은 방법을 취하여 첨가한 후, 37℃에서 10-15분간 방치하여 암세포주를 fibrin clot 형태로 제조하였다. 이때 fibrin clot은 암세포가 90%, fibrinogen과 thrombin 성분이 10%가 되도록 조절하여 제조하였다. (Fig. 6, 7).

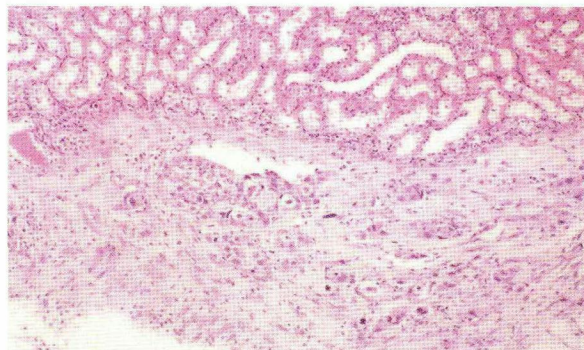


Fig. 6. The microscopic finding of GII reveals several foci of tumor cell apoptosis (HE x 200).

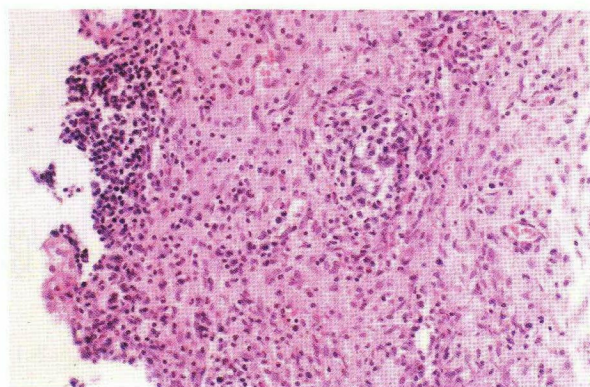


Fig. 7. The microscopic finding of GIII reveals infiltration of numerous lymphocytes and macrophages, but visible tumor cell is not noted.

fibrin clot은 petri dish에 옮겨서 2 x 2 x 2mm 크기의 절편으로 나누어 이식을 시도하였다.

iv) 신피막하 분석법 (Subrenal capsule Assay, SRCA)

신피막하 분석법은 Bogden등^{5,6)}이 기술한 방법으로 실시하였다. S.D. 쥐와 Zucker 비만쥐에 ether를 흡입시켜 전신 마취 후 좌측 복부의 털을 제거하고 betadine[®]으로 소독하였다. 무균적으로 좌측 신상부에 약 1.5cm 길이로 복벽을 절개하여 복강 내에서 좌측 신장을 노출시켰다. 노출시킨 신장피막에 No.11 수술용 칼과 수술용 가위로 약 3mm의 절개를 가하여 피막을 거상한 후 이미 만들어진 fibrin clot을 정밀한 집게로 삽입하여 이식하였다. 쥐의 복벽을 No.3 건사로 연속 봉합한 후 항온 동물 사육실에서 사육하였다. 수술 후 7일째 각각 쥐의 무게를 다시 측정하고 후 부검하여 이식절편의 크기를 측정기 (caliper)로 장축과 단축을 측정하고 이식한 신장을 적출하여 병리학적인 검사를 위해 포르말린 용액 속에 넣어 고정시켰다.

v) 실험쥐의 혈당 검사 방법

혈당검사는 S.D. 암컷쥐에서 폐암세포주 이식 전 10마리에서 혈당검사를 실시하였으나 Zucker 비만 암컷쥐에서는 이식 전에는 실시하지 못하였다. 이어서 모든 실험쥐에서 부검 시 좌측 신장을 적출한 후 좌측신동맥에서 출혈하는 혈액에 hemostick Glucostix[®]을 적신 후 혈당측정기 Glucotrend[®] 2로 측정하였다.

vi) 병리학적인 검사 방법

부검일에 ether 흡입 마취 후 수술대 위에 결박 후 개복은 이전 수술창 보다 크게 하여 좌측 신장을 적출하였다. 적출한 신장은 즉시 측정기로 이식된 종양의 크기를 확인한 후 정확히 가로와 세로의 장단축을 측정하고 포르말린 고정액에 넣어 검사시까지 보관하였다.

일차적으로 이미 고정된 좌측신장을 절개하여 육안적으로 종양의 크기를 다시 측정하고 Hematoxylin-Eosin 염색하여 현미경으로 종양 유무정도, 세포괴사(Apoptosis)

의 괴사 유무정도, 염증 유무정도와 섬유모세포의 존재 유무정도를 관찰하였다. 이때 악성도는 병리조직학적 검사상 종양의 악성도의 소견이 전혀 없으면 - (negative)로 악성도가 경한정도이면 +, 중등도이면 ++, 심한정도 일 경우는 +++로 평가하였다.

vii) 면역억제

이종이식(xenograft)에 대한 거부 반응을 억제하기 위해 모든 실험군에게 cyclosporin-A (cypol[®]Sandoz, 동아제약)을 수술 후 1-6일 까지 80mg/kg를 피하로 주사하였다 (Table 3).

Table 3. Schedule of drug administration

Medications	Implant Days	Implant	Days						Autopsy
			1	2	3	4	5	6	
Group I-IV	Cyclosporin		↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Group I, III	Saline		↑	↑	↑	↑	↑	↑	
Group II, IV	NIC ChemoTx	Navelbine 10mg/kg	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
		Ifosfamide 30mg/kg	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
		Cis-platinum 1mg/kg	↑	↑	↑	↑	↑	↑	

Tx : treatment.

viii) 항암제 투여

S.D. 쥐군과 Zucker 비만쥐군을 항암제 투여군과 생리식염액만 주입한 대조군으로 두 군으로 나누었다 (Table 1).

항암제 투여군은 NIC (Navelbine + Ifosfamide + Cis-Platinum)을 피하주사로 폐암 조직편을 이식한 후 6일간 계속하여 투여하였다 (Table 2).

ix) 이식 성적과 항암제 감수성 평가

저자의 실험에서는 면역성이 없는 연구용 nude mouse를 대신하여 S.D. 쥐와 Zucker 비만쥐를 사용한 관계로 조직 거부 반응을 줄이기 위해 수술 후 1일째부터 cyclosporin-A를 투여하였다. 따라서 실험기간동안 실험군의 생존 유무와 이식후 거부 반응 유무가 본 실험에 있어 중요하였으며 이식한 이식편에서 성장한 종양의 크기 정도도 서로 비교 검토하였는데 이식시는 2 x 2 x 2mm의

크기였으나 부검시에는 두께를 정확히 측정하기 곤란하여 주로 장축과 단축을 측정하여 면적으로 비교하였다.

마지막으로 병리 조직 검사 결과에서 종양 존재 유무, 세포고사(Apoptosis) 유무와 염증 정도 그리고 섬유아세포 유무를 비교 검토하였다.

x) 통계처리

수치는 평균 표준편차로 표시하였고 통계학적 분석을 위하여 SPSS 통계(SPSS inc. USA, Version 10.0) 프로그램을 이용하였으며 Mann-Whitney test, Wilcoxon Signed Rank test, ANOVA test 검증을 시행하였으며 P값이 0.05 미만의 경우를 유의성이 있는 것으로 처리하였다.

실험 결과

세포 배양기에서 성장시킨 인체 폐암세포주 (SW-900)를 fibrin clot으로 고정화시켜 그 세포수를 약 $10^7/\text{mm}^2$ 개 정도 되게 만들어 실험쥐의 좌측 신피막하에 고형암의 (fibrin clot) 형태로 이식시킨 후 모든 실험군에 이중이식에 대하여 7일간 cyclosporin-A 면역억제제를 투여하였다. 또한 NIC로 항암화학치료를 시행한 군과 생리식염액만 투입한 대조군을 서로 비교한 결과 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

1. 실험쥐의 체중변화

이식전 정상적인 S.D. 쥐를 사용한 실험 I, II군과 Zucker 비만쥐를 사용한 III, IV군의 체중 사이에는 이미 200gm 정도의 유의한 무게 차이가 있었다 (Table 4.).

Table 4. The changes of body weights from the date of implant to the date of autopsy

Group	No. of Cases	Body weight (gm)		Δ weights
		Implant	Autopsy	
G I	10	281.0(15.24)*	291.4(18.42)†	10.4
G II	10	288.5(33.42)*	271.7(26.69)	-16.8
G III	7	460.0(32.27)*	475.0(24.49)†	15.0
G IV	7	488.6(17.01)*	497.9(15.77)†	9.3
Mean	34	379.53(24.49)*	384.0(9.25)†	4.48

SRCA : Subrenal capsule assay.

* P < 0.01 between implant and autopsy day of each groups

† P < 0.01 between G I and GIII, IV in autopsy day

폐암세포주를 이식하여 이식일과 부검일간 7일간의 간격으로 측정한 체중에도 차이가 있었다. 이식실험 전 전체 실험쥐의 평균체중은 $379.53 \pm 24.49\text{gm}$ 에서 부검시는 $384.0 \pm 9.25\text{gm}$ 으로 7일간에 4.48gm의 증가된 평균체중의 변화가 있었다 (Table 4, 5).

Table 5. The body weights changes between implant and autopsy SRCA in S.D. and Zucker's obese rats

Group	Number of cases	Body weight (gm)	
		Implant	Autopsy
G I + G III	17	741.0(47.51)	766.4(42.91)
G II + G IV	17	777.1(50.43)	769.6(42.46)
Total	34	1518.1(97.94)	1536.0(85.37)

SRCA : Subrenal capsule assay.

실험 I, III, IV군은 이식 전에 비하여 부검시 약 10gm 이상의 체중증가가 있었고 실험 II군은 항암치료로 인하여 체중이 감소되었으며 실험 IV군은 실험 III군에 비해 체중증가가 적었다. 그 외 항암치료를 시행하지 않은 실험 I군과 III군은 체중이 증가한 것으로 나타났다.

2. 실험군간 혈당의 차이

실험 I 군은 $158.9 \pm 26.04\text{mg}\%$ 이었으며, 실험 II군은 $137.7 \pm 17.86\text{mg}\%$ 로 양군사이의 차이 $21.20\text{mg}\%$ 가 있었다. 그러나 실험 III군과 IV군은 각각 $138.0 \pm 18.35\text{mg}\%$ 와 $132.0 \pm 25.20\text{mg}\%$ 로 양군사이에는 비슷한 혈당치를 보였다. 즉 S.D. 쥐에서는 항암 치료 후 혈당치의 감소가 있었으나 Zucker 비만쥐에서는 항암치료로 인한 혈당치의 증감이 관찰되지는 않았다. 그러나 모든 실험군에서 혈당치는 정상범위내인 것으로 판단된다 (Table 6).

Table 6. The blood glucose levels and tumor sizes after SRCA mean(S.D.)

Group	No. of cases	Blood Glucose (mg%)	Tumor sizes (mm ³)
G I	10	158.9(26.04)	15.3(3.81)
G II	10	137.7(17.86)	15.4(8.90)
G III	7	138.0(18.35)	1.7(1.26)
G IV	7	132.0(25.20)	0.3(0.01)
Mean	34	141.65(21.86)	8.2(3.49)*

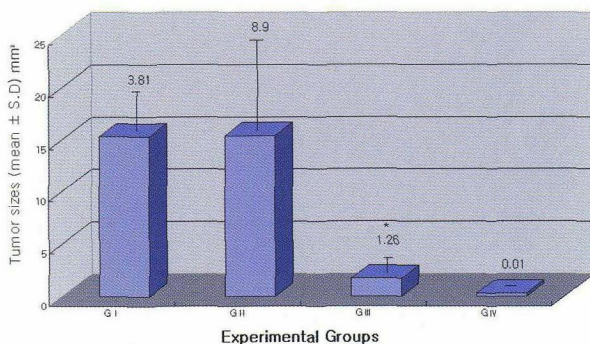
SRCA : Subrenal capsule assay

* P < 0.01 between tumor size of each groups

3. 종양 크기의 평가

폐암세포주로 제조된 fibrin clot을 이식한 후 만 7일째 부검하여 적출한 좌측 신장에서 성장한 종양의 크기를 측정기를 이용하여 장단축의 크기를 직접 측정한 종양의 면적으로 항암화학치료의 감수성 기준으로 사용하였다. 실험대조 I 군은 $15.30 \pm 3.81 \text{ mm}^2$ 으로 이식시의 크기에 비해 종양크기의 증가가 있었다. 실험 II군의 종양크기는 $15.40 \pm 8.90 \text{ mm}^2$ 으로 항암제 투여에 대해서 감수성이 뚜렷이 나타나지 않았다. 실험 III군의 종양크기는 $1.70 \pm 1.26 \text{ mm}^2$ 으로 이식시에 비해 성장하였으나 실험 IV 군에서는 실험 III군에 비해 성장하지 못하여 이식시의 크기보다도 적은 $0.30 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ 이었다(Table 6., Fig. 1).

Fig. 1. The histogram demonstrated tumor sizes of each four group after implantation of lung cancer cells by SRCA.



* P < 0.01 between G I and G III, IV and between G II and G III, IV

4. 병리조직학적 성적의 비교평가

폐암세포주를 이식한 종양의 악성도는 실험 I 군이 중등도 또는 중증도(++ 혹은 +++)에 해당되어 네 군중에서 가장 높은 것으로 관찰되었고 실험 II군은 경도 또는 중등도(+ 혹은 ++)로 그 다음이었으며, Zucker 비만쥐인 실험 III군과 IV군은 비교적 종양의 악성도가 적어 각각 경도 또는 그이하의(- 혹은 +)정도로 관찰되었다. 결과적으로 Zucker 비만쥐에서는 S.D. 쥐에 비해 폐암세포주의 악성도가 적었음이 확인되었다(Table 7., Fig. 2-8).

세포고사현상은 항암치료를 시행한 실험군에서 비교적 많이 관찰되었고 실험 대조 I, III군에서는 적게 관찰되었다.

Table 7. The comparative results of pathologic findings

	malignant potency	Apoptosis or Necrosis	Changes of inflammation	Presence of fibroblast
G I	++ or +++	- or +	- or +	- or +
G II	+ or ++	+ or ++	+	-
G III	- or +	- or +	+	+
G IV	- or ± or +	+ or +	+	-

- : Absent, + : Mild grade, ++ : Moderate grade, +++ : Severe grade.

모든 실험군의 병리표본에서 경도의 염증성 반응이 관찰되어 어떠한 차이점을 발견할 수는 없었다. 병리조직 표본에서 섬유모세포의 발견은 실험 I 군과 III군에서 경도로 관찰되었으나 다른 실험군에서는 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 2-8).



Fig. 2. The microscopic photographs show malignant lung cancer cells cultivated in petri dish. Low(x 100, right) and high(x 200, left) power views.

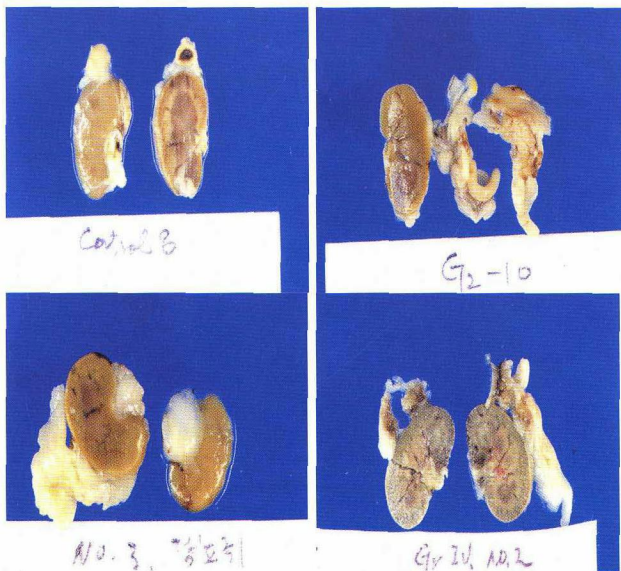


Fig. 3. The gross findings of cut surface of kidney after implantation of human lung cancer cells by SRCA.

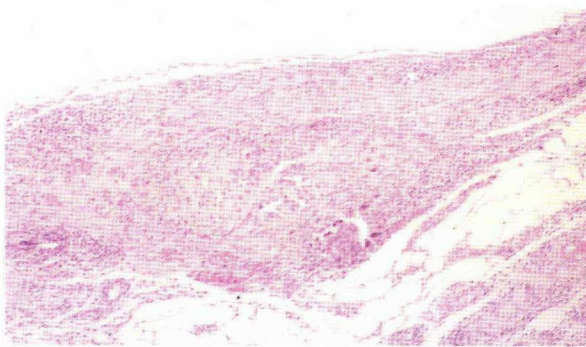


Fig. 4. The microscopic finding of control 7 in G1, shows tumor mass composed of anaplastic epithelial cells(HE x 100).

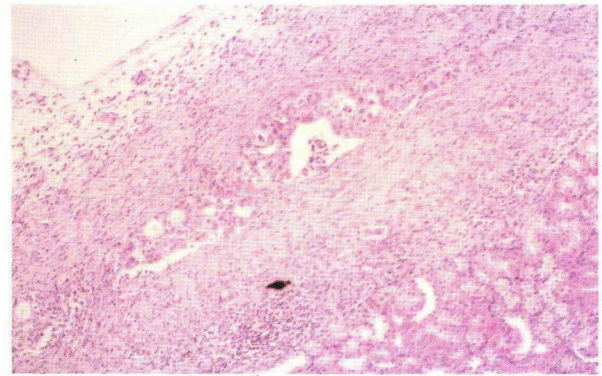


Fig. 5. The microscopic finding of GII. The size of tumor mass is shrunk and tumor cells are degenerated, some of them shows apoptosis against background of inflammation (HE x 200).

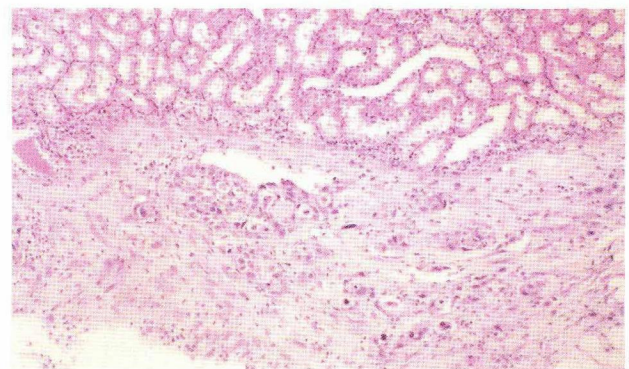


Fig. 6. The microscopic finding of GII reveals several foci of tumor cell apoptosis (HE x 200).

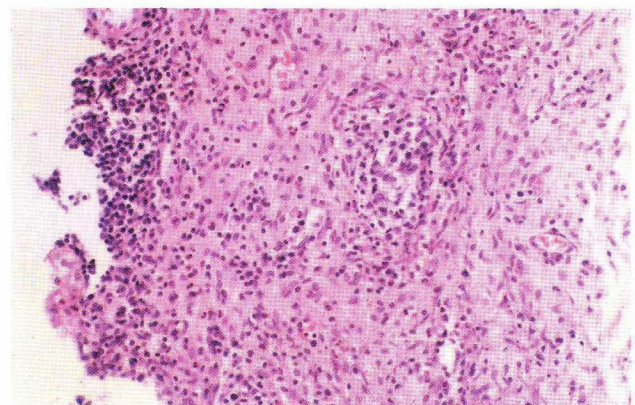


Fig. 7. The microscopic finding of GIII reveals infiltration of numerous lymphocytes and macrophages, but visible tumor cell is not noted.

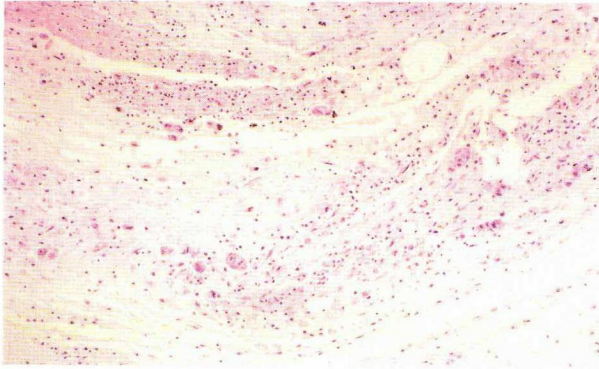


Fig. 8. The microscopic finding if GIV shows scattered tumor cells and nests against background of lymphocyte infiltration.

고찰

한국내의 암환자는 1999년 82,320명 (남자 46,908명, 여자 35,412명)으로 그중 폐암은 국내에서 2번째로 발생이 높고 흔한 암종으로 기록되어 한해 9,953명(12.1%)이었고 발생빈도순으로 보면 남자에서는 3번째(16.1%)이며 여자에서는 6위(6.7%)의 암종이 되었다. 또한 급속히 증가 추세에 있는 현상이 중요시되고 있다.²⁾

폐암에 대한 치료와 연구는 최근에 와서 Iressa[®](ZD 1939 Astrazeneca, USA)¹⁷⁾와 같은 획기적인 신약 개발과 더불어 많은 발전이 있었으나 만족할 만한 결과에는 아직도 미흡한 수준이기에 계속적인 돌파구가 마련되어야 할 시점이다. 일반적으로 종양세포는 상피세포 성장인자(EGF)가 자가분비와 부분비의 과정으로 암세포 표면에 있는 수용체(EGFR)와 결합하면서 증식을 시작하는데 암세포 표면에 붙어 있는 tyrosine kinase를 통해 세포증식과 혈관생성이 일어나는 동시에 세포자살(apoptosis)활동은 억제되어 암이 확산되는 과정을 반복하는 방법으로 성장을 한다. 이때 Iressa[®](ZD 1939)는 세포내에서 tyrosine kinase의 활동을 선택적으로 억제함으로 세포내로 전달되는 신호가 차단되어 암세포가 활동성을 가지지 않도록 작용하는 약제이다.¹⁷⁾ 미국과 일본에서 기존의 화학요법으로 치료에 실패한 난치성 비소세포폐암환자를 대상으로 Iressa 제 II 임상실험을 진행한 결과 18.7%의 종양축소나 관해가 있었으며 38.7%의 증상개선을 보였다고 발표한 바 있다.¹⁷⁾ 이와 같이 기존의 항암 연구에

서의 돌파구가 필요하다.

신평막하 분석법은 생체 내에서 수행할 수 있는 방법으로 항암제 감수성 분석법으로 실시되어 왔으며 결과판정까지 오래 소요되지 않으므로 임상에 적용하기가 쉬운 장점들이 있다. 저자는 Bogden등^{5,6)}이 사용한 nude mouse보다 면역학적으로 적합한 S.D. 쥐와 Zucker 비만쥐를 사용하였다. 따라서 면역억제제인 cyclosporin A가 필요하였다.

Cyclosporin-A는 이미 잘 알려진 약제로서 IL-2와 다른 proinflammatory cytokines에 대한 m-RNA의 전사를 방해하고 T 림파구의 증식을 억제한다. 이 제제는 원발성 편평세포 폐암종에서는 효과가 없으나 전이성 암종에서는 특별히 화학치료에 발생하는 저항력을 환원시키는 효과가 인정되고 있다.^{18,19)} 저자는 위와 같은 효과를 인정하여 본 실험에 cyclosporin A를 이식 후 1일째부터 6일간 피하에 주입하여 이종 이식에 따르는 거부반응의 효과를 호전시키려고 노력하였다.

폐암은 해부학적으로 흉부의 호흡기가 원발장소이나 흉부를 개흉하면 종격동이 막으로 되어 있어 마취시에 양압호흡이 필요하고 이식수술 후 치료에 어려움이 발생하게 된다. 그러한 연유로 복부가 선택되었으며 특히 인체에서 신장은 해부학적으로 후복강에 위치하여 신평막이 얇은 후복막으로 지방조직과 함께 이루어져 있는데 비하여 쥐에서는 접근이 용이하고 신장을 싸고 있는 막은 매우 얇고 투명하며 간이나 비장보다도 취급하기가 쉬운 이점이 있다. 또한 신장은 혈관밀도가 높고 장기 자체의 기능상 산소분압과 영양이 풍부하며 매우 안정된 환경을 준다.⁷⁾

Zucker 비만쥐는 유전적으로 열성인자인 fa/fa로서 비만한 fatty rat과 lean rat한 것으로 2종류가 있다.²⁰⁾ 저자는 비만한 Zucker쥐를 실험의 대상으로 하였다. Zucker 비만쥐는 쉽게 당뇨쥐로 변할 수 있는 특성이 있으므로 유전적인 비만한 인간의 Type II DM의 모형으로서 실험에 이용되나 본 실험에 사용한 Zucker 비만쥐는 아직 당뇨쥐로 발현되지는 않은 상태였다. Lee등²¹⁾의 실험에서 Zucker 비만쥐가 mammary gland carcinogenesis에 좀 더 감수성이 있다고 하였다는 사실과 또한 비만이 세포 혹은 기관(organ) 수준에서도 표현되므로 이에 따른 성장과 대사변화들이 다수 기술되어 있어 저자들도 본 실험

에 사용하게 된 이유이다.

Zucker 비만쥐는 고콜레스테롤혈증과 고지혈증을 나타내는데 이는 주로 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductase (HMG-CoA reductase)의 작용이 활성화되어 나타나는 현상이다. 또한 고지혈증 치료제는 항암효과가 어느 정도 있다고 인정되고 있는데 그 기전은 mevalonate 합성을 촉진하는 역할을 하는 HMG-CoA reductase를 억제하여 간단백의 활성화에 필요한 farnesyl의 생산을 저하시킴으로 간암유전자의 활성화를 막는 작용과 더불어 세포주기 진행을 억제시키고²²⁾, 세포증식을 억제시키거나 세포자연사를 유도하여 동물실험에서는 암의 성장을 저해하는 작용을 가진다.²³⁾

Sakoda등²⁴⁾은 비만인이나 Zucker 비만쥐에서 membrane glycoprotein plasma cell-1 (Pc-1)의 증가를 조사한 결과를 발표하였다. 이러한 사실은 고지방식으로 유발되는 insulin 내성이나 고혈당과는 무관하다고 지적하였다.

음식 섭취가 서구의 권장 기준보다도 많이 높으면 직, 간접적으로 심혈관계 질환과 비만, 그리고 암발생에 연관이 있다.¹¹⁾ 반면에 영양결핍이나 대사 장애는 창상치유가 지연되고 호흡에 관여하는 근육들의 소모와 함께 신체내의 각종기관과 세포들의 환경이 나빠지는 결과를 초래하였다. Fungamalli등²⁵⁾은 암세포내에서 콜레스테롤 합성이 증가되어 있다는 사실을 처음으로 기술한바 있으며 Maltese등은²⁶⁾ 위의 사실을 뒷받침할 수 있는 HMG-CoA reductase가 암조직에서 증가해 있다는 것을 밝혔다.

저자는 일반쥐와 Zucker 비만쥐에서 이식한 암세포주의 성장에 차이가 있을 것으로 예상하여 본 실험을 시작하게 된 동기이다.

항암 감수성 검사법 중 신피막하 분석법은 악성흑막암이나 혈액종양의 연구에 적합하다고 발표하였으나²⁸⁾ 오히려 고형암의 감수성 검사에 적합하다고 말하는 이도 있으며⁷⁾ 저자도 동의하는 사실이다.

감수성 검사에서 ocular microscopic unit(OMU)의 크기인 1 OMU를 0.7mm⁷⁾ 또는 10mm^{9, 13)}로 연구자에 따라 서로 달리하고 있으므로 저자는 오히려 이식시 폐암세포주의 수를 10⁷개로 늘리고 OMU단위보다는 mm²단위로 사용하였다.

신피막하 분석법(SRCA)의 핵심은 배양배지에서 성장시킨 폐암세포주의 세포수와 이식할 수 있도록 고형암화

하는 fibrin clot제조에 있는 것으로 판단되며 저자는 인체의 fibrinogen과 thrombin을 특별히 주문하여 이식한 종양세포주가 이종단백에 대한 염증성 반응이나 거부반응을 최소화시키려고 노력하였다.

항암치료는 폐암의 치료에 가장 보편적으로 많이 사용하는 MIC regimen에서 저자들은 vinorebine을 포함시킨 NIC (or NIP)로 변경하여 임상에 사용하고 있으므로 본 실험에서도 NIC로 실험을 시행하였으며 실험에 사용한 용량은 임상에서 사용하는 치료양에서 산출하여 약물농도에 따른 변화를 제거토록 노력하였다.

신피막하 분석법 이외의 생체에서의 화학감수성 실험 모형으로는 피하주사법과 전이 모형을 들 수 있다.²⁷⁾ 화학 감수성 검사의 성적을 가능 할 수 있는 변수로서는 유일하게 종양의 크기 변화만이 이용된다. 그러나 항암제의 투여가 실험동물이나 인체에 미치는 영향중에 가장 혼란 부작용은 오심과 식욕부진이므로, 이는 항암제 자체의 부작용과 암조직의 파괴로 인한 세포내 화학물질의 혈액 내 유출에 의한 것으로 생각되며 이러한 현상은 결국 체중변화로 나타날 수 있다고 생각된다. 인체에서는 체중이 크므로 변화가 적으나 체중이 적은 실험동물에서는 매우 중요한 변화라고 판단되어 저자들은 본 실험에서 체중변화를 1주령의 증가치의 변화를 변수로 채택한 이유이다. 특히 암컷이 수컷보다도 주령에 따라 체중변화가 적다는 것도 사실이다. 감수성 검사의 결과로 병리학적 변화를 반드시 관찰해야 하는데 임상적으로는 거의 불가능하지만 실험동물에서는 실현 가능한 방법이다. 즉 현미경적으로도 종양크기가 가장 중요하며 다음으로 암세포의 세포분열상(Cell division), 자연세포사정도, 염증반응과 면역 반응도 관련이 있는 소견들이다. Aamal등²⁹⁾은 이식 3일에 숙주 반응이 발생하며 항암 치료에 의해 종양세포 침윤이 감소되고 Edelstein등^{30,31)}은 이식조직의 일부 혹은 대부분이 면역 관련 염증으로 육아 조직으로 대체된다고 지적하고 있다.

Ifosfamide는 cyclophosphamide계의 제재로 세포주기와는 무관하며 간에서 흡수되어 hydroxylation 후 활성화되어 약리작용을 나타내는데 DNA가 주 표적으로 guanine 6,7번, adenine 1,3번과 cytosine 3번 질소에 공유 결합하여 항암 작용을 발현하는 특징을 가진다.

저자가 본 실험에 사용한 NIC regimen은 임상에서 비소

세포암의 치료에 흔히 사용되는 치료제이다. Navelbine은 vinka alkaloid 제제로서 세포주기 M기의 세포 유사 분열 억제에 유효하여 미세튜브의 assembly를 방해한다. 결과적으로 아미노산, cyclic AMP와 glutathione 대사에 관여하며, calmodulin 의존 Ca^{++} 이동, ATPase 활성화도, 세포호흡, 핵산과 지방 생산 등에 주로 억제작용을 통하여 항암작용을 나타내는 고가의 약물이다.

Cis-platinum은 금속제제로서 DNA와 결합하여 alkyl화 항암제와 동일한 작용을 나타내며 세포분열주기 중 S기에만 주로 작용하는 제제로 항암효과가 뛰어난 약물이다.

NIC regimen으로 임상치료 전 미리 감수성 검사를 시행하여 이러한 결과를 가지고 임상 치료결과와 비교한다면, 치료방침에 지침이 될 수 있는 항암제에 대한 종양의 저항력을 사전에 알 수 있는 방법으로 생각된다.

비만은 암의 이환율과 사망률에 직, 간접적으로 연관이 있음이 최근 연구에서 밝혀지고 있다. 폐암의 발생에는 여러 위험인자가 존재하나 비만과 폐암의 관계는 다른 암과는 달라서 비만의 지표로 흔히 사용하는 체질량 지수, 허리/엉덩이 둘레가 폐암의 발생 및 성장에 대한 결과를 보면 상반관계를 나타낸 것으로 보고되고 있다. 즉 비만군에서 폐암의 발생이나 성장이 정상군에 비해 낮은 점인데 이러한 사실은 폐암의 조직형 중 편평세포형일 경우 더욱 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다.^{32,33)} 이러한 연구결과로 보아 흡연과의 관계뿐만 아니라 비만과 관계된 여러 신체대사상태가 편평세포 폐암에 영향을 미치는가에 대해 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

폐암세포주(S-900 GIV)를 배양시킨 후 Fibrin clot화하여 S.D. 암컷쥐와 Zucker 비만암컷쥐의 신피막하에 이식하여 7일간 성장시키면서 면역억제제와 항암제 3종인 Navelbine, Ifosfamide, Cis-platinum으로 화학치료를 시행하였다. 이후 실험대조 I, III군과 II, IV군의 사이에 체중, 혈당 및 항암 치료 감수성을 비교하였으며 아울러 병리조직검사를 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신피막하 분석법은 폐암세포주에 대해서도 적절한 생체검사이며, 또한 빠른 시간 내에 항암 감수성 검사법으로 사용될 수 있음이 확인되었다.

2. NIC 제재를 투여한 실험 II군에서는 실험 I군에 비해 항암치료에 대해 체중이 의미있게 감소하였으며 실험 IV군에서는 실험 III군에 비해 체중이 증가가 둔하였다.

3. 부검시 혈당은 모두 정상범위에 있으나 S.D. 쥐군에서는 항암 치료 후 혈당치의 감소가 있었고 Zucker 비만 쥐군에서는 항암치료로 인한 혈당치의 증감이 관찰되지 않았다.

4. 폐암세포주의 육안적인 크기는 Zucker 비만쥐군보다도 S.D. 쥐군에서 월등히 크게 성장하였으며, 또한 NIC 항암치료에 의한 종양의 크기변화로 보아 Zucker 비만쥐군이 S.D. 쥐군 보다 항암치료 감수성이 유의하게 높았다.

5. 폐암세포주를 이식한 후의 병리조직학적 검사 결과에서 Zucker 비만쥐군이 S.D. 쥐군에 비해 폐암세포주의 악성도가 적었음이 확인되었으며, 또한 항암치료에 대한 감수성은 Zucker 비만쥐군과 S.D. 쥐군에서 모두 유의한 것으로 나타났다.

저자들의 실험에서 신피막하 분석법은 폐암세포주(SW-900)에 대해서도 적절한 생체검사이며, 또한 빠른 시간 내에 항암 감수성 검사법으로 사용될 수 있음이 확인되었다.

NIC 항암치료에 대한 감수성은 병리조직학적 검사 결과에서는 S.D. 쥐군과 Zucker 비만쥐 군 모두에서 유의성이 있었으나 육안적인 폐암세포주의 크기변화로 Zucker 비만쥐군에서 항암치료에 대한 감수성이 보다 높았다. 또한 실험동물인 Zucker 비만쥐군에서의 결과를 참고해 보면 비만에 관련한 대사상태가 폐암세포주의 성장에 영향을 준다는 사실도 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Global cancer statistics. *CA cancer J. Clin.* 49: 33-64, 1999
- Kim HK: Lung cancer in Korea. *Cancer research and treatment.* 34(1): 1-2, 2002
- Marthay RA: Clinics in chest medicine. W.B, Saunders Co. Philadelphia Molecular biology of lung cancer: Clinical implications. 23: 83-101, 2002
- Wu W, Kemp BL, Proctor ML, et al: Expression of DMBT1, a candidate tumor suppressor gene, *Cancer Res.* 59:1846-1851, 1999
- Bogden AE, Kelton DE, Cobb WR, Gulkin TA, Johnson RK: Effect of serial passage in nude athymic mice on the growth characteristics and chemotherapy responsiveness of 13762 and R3230AC mammary tumor xenografts. *Cancer Res.* 38(1): 59-64, 1978
- Bogden AE, Haskell PM, LePage DJ, Kelton DE, Cobb WR, Esber HJ: Growth of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice. *Exp Cell Biol.* 47(4): 281-293, 1979
- Stratton JA, Kucera PR, Micha JP, Rettenmaier MA, Braley PS, Berman ML, DiSaia PJ: The Subrenal capsule tumor implant assay as a predictor of clinical response to chemotherapy. 3 years of experience. *Gynecol Oncol.* 19: 336-347, 1984
- Kava R, Greenwood MRC, Johnson PR: Zucker (fa/fa) rat. *ILAR News.* 32: 4-8, 1990
- Griffin TW, Bogden AE, Reich SD, Ba DA, Hunter RE, Ward A, Yu DT, Greene HL, Costanza ME: Initial clinical trials of the subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. *Cancer.* 52: 2185-2192, 1983
- Reeve JG, Stewart J, Watson JV, Wulfrank D, Twentyman PR, Bleehen NM: Neuron specific enolase expression in carcinoma of the lung. *Br. J. Cancer.* 53: 519-529, 1986
- Velthuis-te WEJ, van den Berg H, West stricte JA, van het Hot KH, de Groaf C: Consumption of reduced-fat products: effects on parameters of anti-oxidative capacity. *Euro. J. Clin. Nutrition.* 50(4): 214-219, 1996
- Hedrich HJ: Genetic monitoring of inbred strains of rats. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, NY 1990, 334-335
- 이민혁, 백상업, 김재준, 허경발: 신피막하 분석법(Subrenal Capsule Assay)을 이용한 인체 위선암세포의 항암제에 대한 감수성 검사. *대한외과학회지.* 39: 313-323, 1989
- Leibovitz A, Am J, Hygiene. 78: 173-175, 1963
- Fingert HJ, Chen Z, Mizrahi N, Gaweski WH, Bamberg MP, Kradin RL: Rapid growth of human cancer cells in a mouse model with fibrin clot subrenal capsule assay. *Cancer Res.* 47: 3824-3829, 1987
- Fingert HJ, Mizrahi N, Bamberg MP, Cohen AM: Histologic studies of human tumors in the subrenal capsule assay (SRCA): Improved growth by enzymatic disaggregation. *AACR Proceeding.* 27: 384, 1986
- Wilmington D, Astrazeneca completes enrollment in phase III non-small cell lung cancer clinical trial program for Iressa® (ID 1839). Astrazeneca. May 8, 2001
- Eccles SA, Heckford SE, Alexander P: Effect of cyclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animal tumors. *Br. J. Cancer.* 42: 252-259, 1980
- Slater LM, Sweet P, Stuperky M, Gupta S: Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. *J Chn Invest.* 77: 1405-1408, 1988
- Weber RV, Stein DE, Scholes J, Kral JG: Obesity potentiates AOM-induced colon cancer. [Journal Article] *Digestive Diseases & Sciences.* 45(5): 890-5, 2000
- Lee WM, Lu S, Medline A, Archer MC: Susceptibility of lean and obese Zucker rats to tumorigenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. [Journal Article] *Cancer Letters.* 162(2): 155-160, 2001
- Gilbert R, Marini P, Janessa A, Bruchelt G, Treuner J, Schweizer P: Inhibition of the membrane localization of p21 ras proteins by lovastatin in tumor cells possessing a mutant N-ras gene. *Oncology.* 51: 320-322, 1994
- Padayatty SJ, Marcelli M, Shao TC, Cunningham GR: Lovastatin induced apoptosis in prostate stromal cells. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 82: 1434-1499, 1997
- Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Onishi Y, Ono H, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T: No correlation of plasma cell 1 overexpression with insulin resistance in diabetic rats and 3T3-L1 adipocytes. [Journal Article] *Diabetes.* 48(7): 1365-1371, 1999
- Fumagalli R, Grossi E, Paoletti P, Paoletti R: Studies on lipids in brain tumors I. Occurrence and significance of sterol precursors of cholesterol in brain tumors. *J. Neuro chem.* 11: 561-565, 1964
- Maltese WA: 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A reductase in human brain tumors. *Neurology.* 33: 1294-1299, 1983
- Stratton JA, Micha JP, Rettenmaier MA, Braley PS: Chemosensitivity testing of nonsolid tumors by the subrenal capsule implant assay. *Gynecol Oncol.* 17: 185-188, 1984
- Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT: Lung cancer. Principles and Practice. Lippincott-Raven. Chapter 11 chemosensitivity testing in lung cancer. James Carmichael, NY. 161-167, 1996
- Aamal S, Fodetad Q, Phil A: Human tumor Xenografts transplanted under the renal capsule of conventional mice. Growth rates and host immuno response *Int J Cancer.* 34: 725, 1984
- Edelstein MB, Fiebig HH, Smink T, Van Putten LM, Schuchhardt C: Comparison between macroscopic and microscopic evaluation of tumour responsiveness using the subrenal capsule assay. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 19(7): 995-1009, 1983
- Edelstein MB, Fiebig HH, Smink T, Van putten LM, Schuchhardt C: Comparison between macroscopic and

- microscopic evaluation of honors responsiveness using the subrenal capsule assay. *Eur. J. Cancer Clin Oncol.* 18: 995-1003, 1983
32. Olson JE, Yang P, Schmitz K, Vierkant RA, Cerhan JR, Sellers TA: Differential association of body mass index and fat distribution with three major histologic types of lung cancer: evidence from a cohort of older women. *Am J Epidemiol* 2002 Oct 1;156(7):606-15
33. Drinkard CR, Sellers TA, Potter JD, Zheng W, Bostick RM, Nelson CL, Folsom AR.: Association of body mass index and body fat distribution with risk of lung cancer in older women. *Am J Epidemiol* 1995 Sep 15;142(6):600-7