

# Cisplatin 내성을 보이는 비소세포폐암 세포주에서의 전이 능력 증가

차 대 원\* · 김 진 국\* · 손 동 섭\*\* · 조 대 윤\*\* · 양 기 민\*\*

=Abstract=

## Resistance to Cisplatin Renders High Metastatic Potential in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line

Dae-Won Cha, M.D.\*, Jhingook Kim, M.D.\*, Dong Suep Sohn, M.D.\*\*, Dai Yoon Cho, M.D.\*\*,  
Ki Min Yang, M.D.\*\*

**Background:** Resistance to cytotoxic drugs such as cisplatin is an important cause of treatment failure in lung cancer. The mechanisms are complex and have yet to be clearly elucidated, but the acquisition of drug resistance possibly has resulted in poor survival. The purpose of the study is to evaluate whether the resistant tumor cells would gain more potential for metastasis. **Material and Method:** we examined the metastatic potential of a cisplatin-resistant cell line, H460/CIS, which was established from the human lung cancer cell line H460 by in vitro selection with gradually increased concentration of cisplatin. The parental cisplatin-sensitive cell line(H460) was used as the control and analysis on the expression of angiogenesis or growth-related factors, gelatin zymographic analysis and in vivo spontaneous metastatic experiment in nude mice were done. **Result:** Increased levels of vascular endothelial growth factor(VEGF) and basic fibroblast growth factor(bFGF) were found in H460/CIS. Gelatin zymographic analyses showed that proteinase A in the culture medium of H460/CIS was processed from latent to activated form. The in vivo experiment showed that H460/CIS cells spontaneously metastasized to the lungs but parental cells did not. **Conclusion:** resistance to the chemotherapeutic agents may render the tumor aggressiveness and metastatic potential. Therefore, the risk, rather than benefit, from inadvertent application of adjuvant or neoadjuvant chemotherapy to early-staged lung cancer should be considered.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2001;34:377-85)

---

**Key words :** 1. Carcinoma, non-small cell, lung  
2. Cisplatin  
3. Neoplasm metastasis

---

\*성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery Samsung Medical Center School of Medicine, Sungkyunkwan University

\*\*중앙대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Chest Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University

논문접수일 : 2001년 2월 14일 심사통과일 : 2001년 4월 19일

책임저자 : 김진국(135-710) 서울특별시 강남구 일원동 50, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 흉부외과. (Tel) 02-3410-3483

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

## 서 론

폐암은 진단 당시 이미 1/3(33%) 정도는 전이된 상태로 발견되며 비록 국소적으로 국한되었다 할지라도 이들의 65%는 수술 후에 원격전이를 일으킨다. 전이성 폐암이 처음에 항암제에 반응을 보인다고 하더라도 항암제에 내성을 가진 질병의 재발로 인해 5년 생존율은 20%를 넘지 않는다. 그리고 컴퓨터 단층 촬영 등의 방사선 진단법외에는 조기에 발견할 수 있는 방법이 없으며 이 경우에도 종양이 어느 정도 크기로 자란 후나 발견이 가능하므로 조기진단에 많은 문제점이 있고, 수술 후 추적검사에서도 암의 재발을 빨리 알 수 있는 특유의 종양표지자가 없으므로 재발 여부의 진단에 많은 어려움이 있다.

폐암치료의 성적을 향상시키기 위하여 수술 전이나 후에 선행화학요법(neoadjuvant therapy)을 시도했지만 생존율이 향상되지 않는 중요한 원인은 여전히 치료에 내성을 지닌 전이이다<sup>1,2)</sup>. 이와 같은 원인의 하나는 종양세포가 생물학적으로 이질적이며 항암제에 대한 반응이 서로 다른 세포들(subpopulation cell)로 구성되어 있다는 사실이다<sup>3-5)</sup>. 항암화학요법은 종양내에 처음부터 존재하던 항암제에 내성을 지닌 세포집단만을 선택적으로 생존시킬 수 있다. 결과적으로 cisplatin과 같이 DNA 에 손상을 줌으로서 유전자의 불안정성을 증가시킬 수 있는 약제에 의해 선택된 세포집단은 생물학적 변형과 외부환경에 빠른 적응을 보이게 되며 종양세포의 재발이나 전이 능력을 향상시킬 가능성이 있다<sup>1)</sup>. 최근에 약제 내성의 기전이 일부 밝혀짐으로 인해 약제에 민감한 종양이 어떻게 내성을 지니게 되는가에 대한 이해의 실마리가 보이게 되었다. 특히 Glutathione synthetase의 up-regulation, mdr-1 유전자의 증폭, topoisomerase의 변형, p53 변이, bcl-2 유전자의 과발현 등을 포함한 약제 내성의 여러 기전이 알려졌다. 많은 보고에서 p53의 변이와 bcl-2의 과발현이 혈액암에 임상적으로 연관이 있다고 밝히고<sup>6,7)</sup> 있으나, 고형종양에 경우에는 DNA 손상약제에 대한 반응이나 악성종양으로의 변화에 미치는 영향에 대해서는 아직 명확하지 않다. B16 melanoma의 경우 다중 약제에 대한 내성(multi-drug resistance, MDR)과 전이의 능력이 밀접한 관계에 있다고 보고된 바 있다<sup>8)</sup>. 전립선암에서도 고사에 내성을 지닌 LNCap 세포가 전이 능력이 증가되었다는 보고<sup>9)</sup> 등 연구가 이루어지고 있으나 폐암에서 내성과 전이의 상관 관계에 대해 명확히 밝혀진 바는 없다.

최근 들어 폐암 수술 후 재발의 원인이 수술 전 이미 존재했던 미세 전이일 가능성이 있다는 지적이 있고, N2 전이가 있는 제 IIIA 병기 비소세포폐암에 있어서 수술 전 항암화학요법이 폐암절제술의 상승, 병기의 감소와 더불어 생존율의

향상 등이 보고되고 있다<sup>10,11)</sup> 이를 바탕으로 하여 수술 가능한 초기의 폐암 환자에게 선행화학요법을 시행하려는 연구들이 진행되고 있다.

본 연구에서는 인간 비소세포폐암세포에서 cisplatin 내성과 전이 능력 증가와의 상호관계를 밝히기 위해 항암화학요법에 실패한 후 재발한 암의 생물학적 침습성과 약제내성을 지닌 세포주(H460/CIS)를 체외 배양하여 만들었다. 이 세포주를 이용하여 항암제에 내성을 지닌 암세포가 성장과 전이의 능력이 증가하는지 알아보기 위해 전이성 유전자의 발현양상을 검사하였다. 또한, cisplatin 내성 세포의 생물학적 특성을 알기 위해 in vivo 실험을 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주와 세포배양

H460은 wild type의 p53을 갖는 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)의 세포주로 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. 이 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO BRL, Eggenstein, Germany), 100units/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin(GIBCO BRL, Eggenstein, Germany), 0.2% Fungizone(GIBCO BRL)이 포함된 RPMI 1640(BIOWhitaker, Walkersville, USA)를 사용하여 37°C와 5%의 CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 배양하였다. H460/CIS는 항암제인 cisplatin(동아제약, Seoul, Korea)에 내성이 있는 세포주로 H460 세포주에 cisplatin 투여 용량을 3개월에 걸쳐 0.01 µg/ml 부터 2 µg/ml 까지 증량하여 내성세포를 만든 후 마우스에 주사하여 폐에 암을 유발시켜 이를 체외 배양하여 만든 세포주이다. 이 세포주 또한 위와 동일한 방법으로 배양하였다.

### 2. MTT assay

H460 세포와 H460/CIS 세포에 cisplatin을 처리한 후 내성 여부를 비교하고, 다른 항암제에 대한 교차내성 여부를 확인하기 위하여 MTT colorimetric assay를 수행하였다. Trypan blue를 이용하여 세포 수를 측정 후 96well plates의 각 well에 3×10<sup>3</sup> 개의 세포를 분주하였다. 24시간이 지난 후 항암제를 다양한 농도로 처리하였고, 1시간 후 새로운 배지로 교환하였다. 48시간 후 5 mg/ml의 MTT 용액(Sigma, St Louis, MO) 50 µl를 각 well에 첨가하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 50 µl DMSO(Dimethylsulfoxide, Amresco, Solon, OHIO, USA)로 MTT-formazone을 녹여서 씻어준 후, 540 nm(with reference at 650 nm)에서 microculture plate reader(Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

### 3. 항암제 처리

H460 세포와 H460/CIS세포에 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 cisplatin을 각각 RPMI-1640 배지에 넣어 잘 섞은 후 농도별로 처리하여 4시간 동안 배양 후 배지로 cisplatin을 세척하고 새 배지로 교환 후 RNA와 단백질의 분리에 사용하였다.

### 4. Plasmid 분리

QIAGEN Plasmid purification Kit(Valencia, CA, USA)를 사용하여 plasmid를 분리하였다. SOLR cell을 LB-ampicillin(50  $\mu$ g/ml) broth에 37°C에서 밤새 진탕 배양한 후 1.5 ml tube로 옮겨 원심분리 하였다. 여기에 100  $\mu$ l의 buffer P1을 넣고 현탁한 후 200  $\mu$ l의 buffer P2를 첨가하고 섞은 후 ice에 방치하였다. 12000 g에서 5분 동안 원심분리 한 후 상층액을 colume으로 옮긴 다음 12000 g에서 원심분리하고 1ml의 buffer QC로 2회 세척 후 500  $\mu$ l의 buffer QF를 colume에 넣었다. DNA가 포함된 buffer QF에 0.6배 부피의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 13000 g, 4°C에서 30분 동안 원심분리 한 다음 상층액을 제거하였다. DNA pellet은 1ml의 70% ethanol을 넣고 세척한 후 13000 g에서 30분간 원심분리하고 상층액을 버린 후 DNA pellet을 건조시켜 적당량의 2차 증류수에 용해시켰다.

### 5. RNA 분리

100 mm dish에 배양한 세포를 1 ml의 TRIZOL Reagent(GIBCO BRL)를 넣어 용해한 후 용해액을 1.5 ml tube로 옮겼다. 0.2 ml의 chloroform을 첨가하고 강하게 흔들어서 준 후 실온에서 5분간 방치하였다. 이를 4°C, 12000 g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 새 tube로 옮겼다. 다시 동량의 chloroform을 첨가하여 섞은 후 4°C, 12000 g에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 취한 후 0.5 ml의 isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C, 12000 g에서 15분간 원심분리하여 상층의 isopropyl alcohol을 제거한 후 75% ethanol을 1 ml 첨가하여 pellet을 세척하였다. 4°C, 12000 g에서 15분간 원심분리 후 ethanol을 제거하고 pellet을 공기 중에 건조시킨 후 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 후 증류수 20  $\mu$ l에 녹여 -70°C에 보관하였다.

### 6. Northern blot 분석

TRIZOL Reagent(GIBCO BRL)을 이용하여 분리한 10l의 RNA에 10 $\times$  MOPS 2  $\mu$ l, formaldehyde 3.5  $\mu$ l, formamide 10  $\mu$ l를 넣고 65°C에서 15분간 가열하여 denature한 후 ice에 정지하였다. 2 $\times$  roading dye와 EtBr을 넣어 섞은 후 2.2 M

formaldehyde, 1 $\times$  MOPS를 포함한 1.2% agarose-formaldehyde gel에 40V로 전기영동하였다.

전기영동된 RNA를 nylon membrane(Hybond-N: Amersham Pharmacia biotech, Buckinghamshire, England)에 20 $\times$  SSC를 이용하여 capillary 방법으로 6시간 동안 전이시켰다. RNA가 전이된 membrane을 GS Gene Linker UV Chamber(BIO-RAD)를 사용하여 150mJ/cm<sup>2</sup>의 UV로 RNA를 고정하였고 사용하기 전까지 membrane을 4°C에 보관하였다. Probe(angiotensin-1, brain specific angiogenesis inhibitor-1, caveolin-1, CPP32, basis fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, thrombospondin-1)는 vector에 cloning된 부분을 restriction enzyme(angiotensin-1:EcoR I, caveolin-1: Xho I/BamHI, CPP32 : EcoRI, bFGF : EcoRI/HindIII, VEGF: BamHI/EcoRI, TSP-1: EcoRI/SmaI)을 넣어 37°C에서 2시간 동안 반응시켜 자른 후 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하고 insert 부분이 있는 gel을 잘라내어 ZETSORB(GENOMED, Germany)를 이용하여 elution 하였다. Elution한 DNA 2  $\mu$ g을 100°C에서 10분간 가열한 후 ice에 정지하였다. Denature된 DNA에 dATP, dGTP, dTTP(각각 0.5Mm, BM)를 각각 1  $\mu$ l를 넣고 hexanucleotide 가 포함된 2  $\mu$ l의 reaction mixture(Boeringer Mannheim, BM)를 넣었다. 여기에 Klenow enzyme(2U/ $\mu$ l, BM)을 1  $\mu$ l첨가하고 32p-dCTP(Amersham Pharmacia biotech)를 5  $\mu$ l 첨가하여 섞은 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 합성된 probe를 100°C로 10분간 가열하고 ice에 정지한 후 hybridization용액과 섞어 prehybridization 해 놓았던 membrane에 넣고 42°C에서 밤새 반응시켰다. 밤새 반응시켰던 membrane을 2 $\times$  SSC, 0.1% SDS 용액으로 실온에서 30분간 세척하였다. 그 후 2 $\times$  SSC로 60°C에서 30분간 세척하였다. 세척한 membrane에 X-ray film을 넣어 -70°C에서 24시간 동안 노출시켰다. developer를 이용하여 X-ray film을 현상하여 RNA의 발현정도를 확인하였다.

### 7. Protein 분리

Protein은 세포가 90% 정도 자랐을 때 분리하였다. plate에서 배지를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 세척 후 scarper로 세포를 plate에서 분리한 후 1 ml의 PBS로 현탁하여 1.5 ml tube에 옮긴 후 13000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층의 PBS를 제거하고 RIPA buffer(150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1000 g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride) 100  $\mu$ l를 넣고 ice에 넣었다. 주사기(26G)로 세포를 파괴한 후 13000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 tube로 옮기고 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

## 8. Western blot 분리

분리한 단백질을 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 정량한 후 4× sample buffer[100 mM Tris-HCl(pH 6.8), 4%(w/v) SDS, 2%(v/v) 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, deionized distilled water]와 섞고 5분 동안 끓인 후 원심분리하여 10% SDS-polyacrylamide gel에서 80V로 전기영동 하였다. 단백질의 분자량은 BIO-RAD 의 prestained marker(Broad range)를 사용하여 확인하였다. 전기영동이 끝난 gel 상의 단백질은 PVDF membrane(ImmobilionTM-P, MILLPORE)에 40V로 2시간 동안 glycine buffer(20% methanol, 0.1% SDS, 48 mM Tris base, 390 mM glycine)을 이용하여 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane은 5% skin milk를 넣은 후 TTBS buffer(50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.5M NaCl, 0.05% Tween 20)로 2시간 동안 상온에서 blocking한 후 1% skin milk를 넣은 후 TTBS buffer에 antibody를 1:500 으로 희석하여 membrane을 넣은 후 1시간 동안 반응시켰다. TTBS로 3회 세척 후 1% skin milk를 넣은 TTBS에 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 또는 anti-rabbit immunoglobulin을 넣은 후 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TTBS로 3회 세척한 후 ECL system(Amersham Life Science Co)을 이용하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 band를 확인하였다.

## 9. Zymography

Miyagi 등<sup>27)</sup>의 방법을 변형하여 zymography를 수행하여 세포주의 gelatin 분해 활성을 확인하였다. 세포를 scraper를 이용하여 떼어낸 후 sample buffer에 용해하여 protein을 분리한 후 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad)를 이용하여 정량하고 20 μg의 sample에 gel loading buffer[4% (w/v) SDS, 125 mM Tris-Cl(pH 6.8), 10% (v/v) glycerol]를 넣고 1mg/ml의 gelatin을 넣은 polyacrylamide gel에 가열하지 않은 sample을 넣고 80V로 전기영동하였다. 전기영동 후 gelatin-polyacrylamide gel을 renaturation solution(2.5% triton X-100, 50mM Tris-Cl, pH 7.5 and 0.1M NaCl)에 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰고 metalloproteinase의 활성을 측정하기 위해 gel을 collagenase buffer[50 mM Tris-Cl, pH 7.6 and 0.2M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2%(v/v) Brij-35]에서 37℃에서 48시간 동안 반응시켰다. Gelatinase 활성을 확인하기 위해 gel을 50% methanol과 10% acetic acid에 녹인 0.5% Coomassie brilliant blue G-250로 1시간 동안 염색하였다. 효소의 활성은 각각의 sample에서 효소 활성이 나타난 위치는 염색되지 않는다는 것으로 결과를 확인하였고 Bio-Rad molecular weight standards(Broad range)로 분자량을 확인하였다.

## 10. In vivo 실험

In vivo 실험에 Charles River, Japan, Inc.에서 구입한 6주된 수컷의 nude 마우스(BALB/C-nu-Crj)를 이용하였고 병원체에 감염이 되지 않는 시설(Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea)내에서 사육되었다. 암의 유도된 전이와 자발적 전이를 확인하기 위하여 세포를 trypsin처리하여 떼어내어 모은 후 serum이 없는 배지로 세척하고 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 세포를 부유시켰다. Trypan blue exclusion 실험으로 single-cell suspension이 90% 이상 생존해 있음을 확인한 세포를 사용하였다. 먼저 암의 유도된 전이를 확인하기 위하여 H460, H460/CIS세포를 각각  $5 \times 10^5$  개씩 0.1 ml의 HBSS에 부유시켜 nude 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 실험에 사용한 마우스는 각각 10마리였다. 1일 후 cisplatin 25 mg/kg를 주사하였다. 4주 후 마우스를 희생시켜 폐를 떼어 내었다. 떼어낸 폐는 모두 burin solution에 고정한 후 육안적으로 보이는 전이 결절의 여부를 확인하였고 paraffin block을 만든 후 hematoxylin /eosin(H/E)으로 염색하여 병리학적으로 전이 여부를 확인 하였다. 또한 H460, H460/CIS세포를 각각  $1 \times 10^6$ 개씩 0.1 ml의 HBSS에 부유하여 Filder et al.(1995)의 방법에 따라 마우스의 발바닥에 이식하였다. 각각 10마리의 마우스를 사용하였다. 이식 후 4주가 지난 뒤 마우스의 발바닥에 종양의 형성을 확인하였다. 종양이 형성된 다리를 대퇴부의 중간까지 잘랐다. 6주 후 마우스를 희생시켜 폐를 떼어내었다. 떼어낸 폐는 위와 동일한 방법으로 처리한 후 육안적, 병리학적 전이 여부를 확인하였다.

## 결 과

### 1. 차등농도의 cisplatin 처리 후 내성세포주 확보

H460세포에 cisplatin의 농도를 점차적으로 증가시키면서 3달간 배양한 후 고농도의 cisplatin을 처리한 배지에서 자라는 세포를 관찰하였다. In vitro에서 확보된 cisplatin에 대하여 내성을 갖고 있는 H460 cell의 생물학적인 특성으로 세포의 성장속도(doubling time)가 모세포(H460)에 비하여 2.4배 증가된 것으로 관찰되었다. 세포의 크기는 모세포 보다 3배 정도 크게 관찰되었다(Fig. 1).

### 2. MTT assay를 통한 내성확인

In vivo에서 확보된 H460/CIS 세포의 내성여부를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 모세포와 H460/CIS 세포를 96 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후 각각 다른 농도의 cisplatin을 처리한 후 세포의 생존 비율을 MTT solution에 의하여 분석하였다. 그 결과로 IC50이 H460 세포

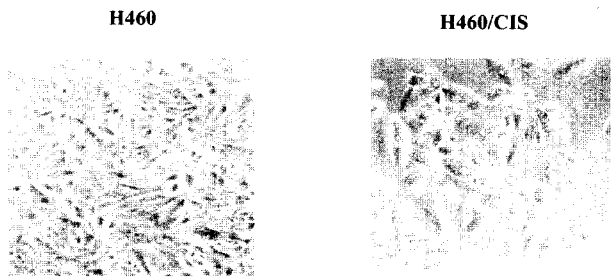


Fig. 1. The morphology of non small cell lung cancer cell lines(H460, Cisplatin sensitive cell line; H460/CIS, Cisplatin resistance cell line)

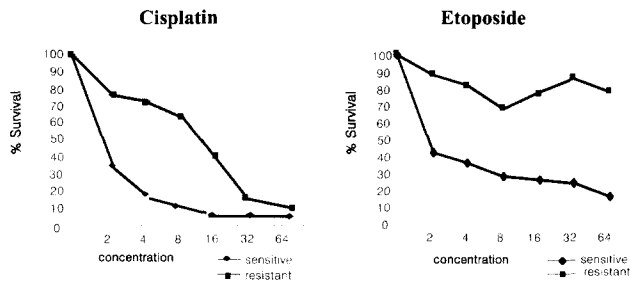


Fig. 2. MTT analyses for anticancer drug resistance in H460 and H460/CIS cell lines. (Concentration (ng/ml), Sensitive : H460, Resistance : H460/CIS)

인 경우 약 0.75 g/ml로 나타난 반면 H460/CIS 세포인 경우 4.5 g/ml로 나타났다. 이는 H460/CIS 세포가 모세포 보다 cisplatin에 대하여 6배 정도 내성을 갖는다는 것을 의미한다 (Fig. 2). 유전자 손상을 일으키는 cisplatin과 유사한 항암제에 대하여 내성을 가질 수 있다는 보고를 기초로 Etoposide를 이용하여 MTT assay를 시행한 결과 역시 H460/CIS세포에서 높은 내성을 나타내었다(Fig. 2).

### 3. tRNA 발현 분석을 통한 약제 내성과 전이 관련여부 확인

Angiopoietin-1(ANG-1)은 혈관내피 세포의 성장인자로 두 세포주 모두 약하게 발현되었으나 H460/CIS 세포에서 cisplatin 농도 증가에 따라 H460세포보다 더 많이 발현되었다(Fig 3). Vascular endothelial growth factor(VEGF)는 암의 성장과 증식에 중요한 요소로 전이에 중요한 angiogenic factor 인데 H460세포에서 VEGF는 발현되었으나 cisplatin 처리에 따른 변화는 거의 없었다. 이에 비해 H460/CIS 세포에서는 H460세포보다 VEGF 가 많이 발현되었으며 cisplatin 농도가 증가함에 따라 발현이 증가되었다(Fig. 3). Brain-specific angiogenesis inhibitor(BAI-1)는 angiostatic factor로 신생혈관 형성을 억제하는 작용을 하는 요소로 H460세포에서 발현되

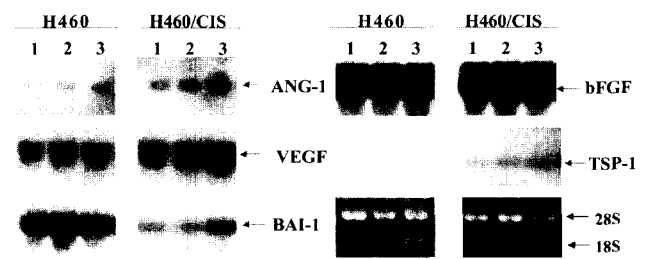


Fig. 3. Northern blot analyses for the expression patterns of metastasis related genes in H460 and H460/CIS.

1. No treatment.
  2. Treated with 1g/ml of cisplatin
  3. Treated with 5g/ml of cisplatin
- (ANG-1, angiopoietin-1; bFGF, basic fibroblast growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; TSP-1, thrombospondin-1; BAI-1, brain specific angiogenesis inhibitor-1)

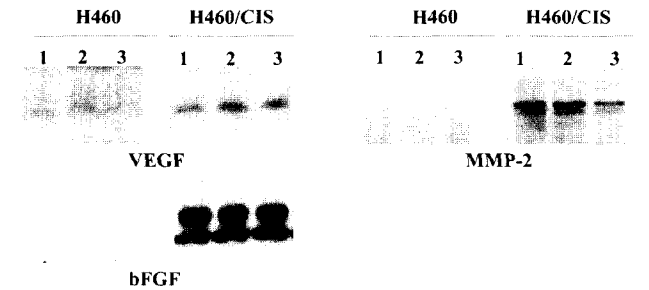


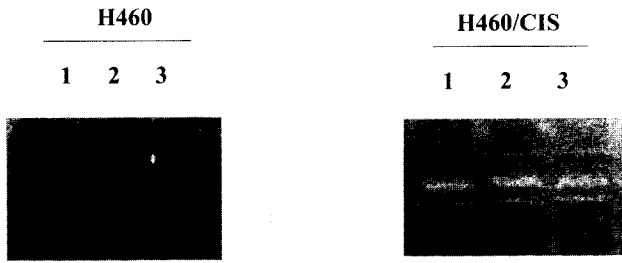
Fig. 4. Western blot analyses for the expression of metastasis related genes in H460 and H460/CIS

1. No treatment.
  2. Treated with 1g/ml of cisplatin
  3. Treated with 5g/ml of cisplatin
- (VEGF, vascular endothelial growth factor; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; bFGF, basic fibroblast growth factor)

었고 H460/CIS 세포에서는 H460 세포에 비해 적게 발현되었다. Basic fibroblast growth factor(bFGF)는 암의 성장에 중요한 요소로 H460과 H460/CIS세포 모두에서 발현되었으나 cisplatin의 농도간 차이와 세포주간의 차이는 없었다(Fig. 3). Thrombospondin-1(TSP-1)은 antiangiogenic factor로 H460과 H460/CIS에서 모두 미약하게 발현되었으나 H460/CIS에서 H460 보다 발현이 강하였다(Fig. 3).

### 4. 전이 관련 유전자의 단백질 발현 분석

전이 관련 유전자인 VEGF, bFGF, Matrix Metalloproteinase 2(MMP-2) : Type IV collagenase를 단백질 발현을 통해 확인 하였다. VEGF는 H460 세포주에서 발현이 되나 미약하였고 cisplatin 농도에 따른 차이를 발견할 수 없었다. H460/CIS는



**Fig. 5.** Zymography for expression of type IV collagenase in H460 and H460/CIS  
1. No treatment.  
2. Treated with 1g/ml of cisplatin  
3. Treated with 5g/ml of cisplatin

VEGF가 H460에 비해 많이 발현되었고 cisplatin 처리 농도에 따라 약간의 증가를 보였다(Fig. 4). bFGF는 H460세포와 H460/CIS 모두에서 발현 되었으나 H460/CIS 세포에서 더 많이 발현됨을 확인하였다. 두 세포주 모두 cisplatin 농도의 증가에 따른 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4). MMP-2는 H460세포주에서는 거의 발현되지 않았고 H460/CIS에서는 발현되었으나 두 세포주 모두 cisplatin 농도에 따른 차이는 보이지 않았다(Fig. 4).

5. Zymography를 통한 침습성 확인

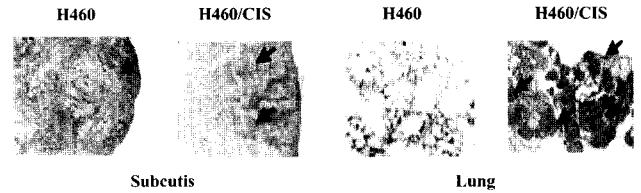
Zymography 를 수행하여 type IV collagenase의 활성정도를 본 결과 H460세포에서는 1 mg/ml의 gelatin gel이 거의 분해되지 않아 많이 발현되지 않음을 확인할 수 있었으나 H460/CIS 세포는 gelatin을 분해하는 gelatinase의 활성을 보여 배양액내에서 proteinase A가 활성화됨을 확인할 수 있었다. Cisplatin 처리 농도에 따라서는 gelatinase활성의 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5).

6. vivo 실험을 통한 전이 확인

유도된 전이를 알기 위한 실험에서 H460/CIS세포를 주입한 마우스 10마리 중에서 9마리의 폐에서 종양이 형성되었으나, H460세포를 주입한 쥐의 경우 10마리 중에서 2마리에서만 폐에 종양이 형성되었다(Fig. 6).

자발적인 전이를 알기 위한 실험에서 H460/CIS세포를 발바닥에 이식한 마우스 10마리 중에서 8마리의 폐에서 종양이 형성되었으며 H460세포를 이식한 쥐 10마리에서는 종양이 형성되지 않았다(Fig. 7) (Table 1).

전이 발생한 폐에서 전이결절의 수가 너무 많아 육안적으로 숫자를 파악하는 것은 불가능하였다.



**Fig. 6.** Induced metastasis of H460 and H460/CIS cell lines (arrow indicate tumor growth)

**Table 1.** The results of induced and spontaneous metastasis

Cell line	Tumorigenicity	Induced metastasis	Spontaneous metastasis
H460	10/10(100%)	2/10(20%)	0/10(0%)
H460/CIS	10/10(100%)	9/10(90%)	8/10(80%)

Tumorigenicity : tumor growth at the subcutaneous tissue

고찰

암의 전이는 매우 복잡하고 연관적인 여러 단계를 거쳐야 하며 숙주의 방어 기전에 생존하는 종양 세포에 의해 이루어진다. 전이의 단계별 진행과정을 보면 다음의 일련 과정을 거치게 된다. 먼저 암세포는 초기에 확산(diffusion)을 통해 주위 미세 환경으로부터 영양을 공급받으면서 점차 증식하게 된다. 다음 단계로 종양의 크기가 직경 1~2mm 가 넘어 성장하기 위해서는 혈관신생이 일어나야 한다<sup>12)</sup>. 이러한 혈관신생은 종양세포와 내피세포, 상피세포, 중피세포, 백혈구 등으로부터 분비되는 물질들에 의해 매개되는데, 여기에는 FGF, VEGF, vascular permeability factor(VPF), platelet derived growth factor(PD-ECGF), epithelial cell growth factor(EGF), transforming growth factor- or, interleukin-8(IL-8), angiogenin, fibrin, nicotinamide 등이 있다<sup>13,14)</sup>. 이와 같은 요소들의 축진에 의해 혈관이 형성되고 증식하면서 일부 종양세포는 응집 인자의 발현이 줄어들고 운동성이 증가함에 따라 원발 병소로부터 떨어져 나오게 되며, 이러한 세포들은 모세 혈관 혹은 림프관을 통해 순환기계로 진입하게 된다. 순환기계 내부의 단일 종양세포는 혈전을 형성하게 되고 대부분의 순환하는 종양세포는 신속히 파괴되지만 생존하는 세포는 타 장기의 모세혈관내피세포나 혈관내피세포하 기저막에 부착하게 된다. 부착 후 종양세포는 혈관내에서 증식할 수도 있지만 대부분의 경우 혈관외로 탈출하여 증식하게 된다. 이 과정에

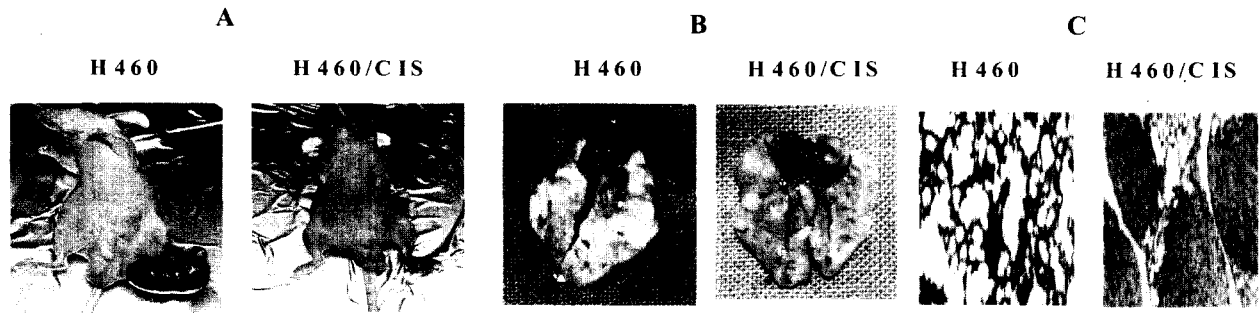


Fig. 7. Spontaneous metastasis of H460 and H460/CIS cell lines(A: Tumorigenesis of nude mouse, B: burin solution, H460: no tumor nodule, H460/CIS: multiple tumor nodules, C: H/E stain, H460: no tumor growth, H460/CIS: tumor growth)

서 종양세포는 기저막이나 간질의 세포외기질을 분해하는 효소들을 분비하게 되는데 이 효소들에는 metalloproteinase와 metal-dependent endopeptidase family 들이 있으며 이러한 효소들은 많은 종양세포와 결합조직으로부터 분비되며 interstitial collagen, type IV collagen, type V collagen, gelatin, proteoglycan들을 분해한다. 금속단백질 분해효소는 interstitial collagenase, stromelysins, gelatinase(type IV collagenase)로 분류된다<sup>15)</sup>. 많은 전이성 종양 세포들은 기저막의 proteoglycan을 분해할 수 있는 효소를 생산하는 것으로 알려져있다.

Cisplatin은 효과가 뛰어난 항암약제로 폐암 치료에 널리 쓰이고 있다. 그러나 치료도중 발생할 수 있는 폐암세포의 약제내성은 여전히 중요한 문제로 남아있다. 종양이 약제내성을 갖게되는 원인이 지금까지는 뚜렷이 밝혀져 있지 않지만 가장 잘 밝혀진 것 중 하나가 내성을 보이는 암세포는 다중약제내성 단백질(multi-drug resistant protein-1, MDR-1)을 갖고 있다는 것이다<sup>16)</sup>. 이중 대표적인 것이 ATP-7 binding cassette(ABC) transporter P-glycoprotein(Pgp-1 또는 MDR-1)으로 원형질막 glycoprotein이다<sup>17)</sup>. 이 MDR-1의 정확한 역할은 알려져 있지 않지만 직접 약제를 세포막 밖으로 내보낸다는 "drug pump" 모델과 직접 약제를 내보내지는 않으나 MDR-1의 변화된 발현이 이온 수송이나 신호 전달의 조절을 변화시키게 한다는 약제의 수동확산의 의미인 "altered partitioning" 모델이 있으나 약제 내성에 관한 좀더 복잡한 경로가 있는 것으로 보인다<sup>18)</sup>. 이 이외에도 생각되고 있는 약제 내성의 기전으로는 약제의 독에 대한 중화반응의 증가, DNA 손상복구인자의 변화, 종양관련 유전자 발현의 변화, 세포고사의 저지 등이 거론되고 있다<sup>19)</sup>. Liotta 등<sup>20)</sup>에 의하면 이러한 여러 기전들간의 복합적 작용으로 인하여 유전자의 변형을 일으킨 암세포가 결국에는 침습성이나 전이능력의 증가를 보일 수 있다고 한다. Mitsumoto 등<sup>21)</sup>은 악성상피세포암을 가지고 있는 쥐에게 반복적으로 cisplatin을 주입하여

얻은 약제내성 세포주가 전이능력이 증가하며 단백분해효소인 gelatinase의 활성이 증가하였다고 밝히고 있다. 또한 Osmak 등<sup>22)</sup>에 의하면 후두암에서 cisplatin에 내성을 가진 세포에서 암의 침습성과 관련이 있는 cathepsin D, urokinase type plasminogen activator, inhibitor of plasminogen activator type 1의 발현이 증가되었다.

본 연구에서는 cisplatin에 내성을 보인 폐암세포의 전이 능력이 향상되는지의 여부를 알기 위하여 cisplatin에 내성을 보이는 폐암세포주(H460/CIS)를 만든 후 cisplatin에 민감한 세포주(H460)와 비교하여 nude 마우스에서 in vivo 실험을 통하여 각각 세포의 자발적인 전이와 유도된 전이의 결과를 비교해 보았다. 그 결과 cisplatin에 내성을 보인 세포주(H460/CIS)가 자발적인 전이와 유도된 전이 모두에서 전이를 더 잘 일으킨다는 결과를 얻을 수 있었다. In vivo 실험의 결과를 토대로 cisplatin내성과 전이 능력 증가의 상호 관계를 규명하기 위하여 in vitro 실험을 시행하였다. 실험결과 H460/CIS 세포주에서 전이 관련 유전자로 알려진 ANG-1, VEGF, bFGF, MMP-2 등이 더 발현되었고, 전이의 침습성을 유발하는 gelatinase의 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 따라서cisplatin에 내성을 갖는 세포가 약제에 민감한 세포에 비해 전이 능력이 증가될 수 있다는 사실을 시사한다.

결론적으로 본 연구 결과를 통해 cisplatin에 내성을 가진 비소세포폐암세포에서 전이 능력이 증가될 수 있다고 여겨지며 이러한 것들을 토대로 초기 비소세포폐암 환자의 수술 전 항암약물요법의 타당성에 대한, 많은 임상적 연구가 필요 하리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award

- lecture. *Cancer Res* 1990;50:6130-8.
- Sugarbaker EV. *Cancer metastasis : a product of tumor-host interactions*. *Curr Probl Cancer* 1979;3:1-3.
  - Radinsky R, Fidler IJ. *Regulation of tumor cell growth at organ-specific Metastases*. *In Vivo* 1992 Jul-Aug; 6(4): 325-31.
  - Heppner G. *Tumor heterogeneity*. *Cancer Res* 1984;44: 2259-65.
  - Fidler IJ, Hart IR. *The development of biological diversity and metastatic potential in malignant neoplasms*. *Oncodev Biol Med* 1982;4:161-76.
  - Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53 mutations in human cancers*. *Science* 1991 5;253:49-53.
  - Tsujimoto Y, Gorhm J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. *The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining*. *Science* 1985;229:1390-3.
  - Staroselsky AN, Mahlin T, Savion N, et al. *Metastatic potential and multidrug resistance correlation in the B16 melanoma system*. *J Exp Ther Oncol* 1996 Jul;1(4):251-9.
  - Pousette A, Carlstrom K, Henriksson P, Grande M, Stege R. *Use of a hormone-sensitive(LNCaP) and a hormone-resistant(LNCaP-r) cell line in prostate cancer research*. *Prostate* 1997 15;31(3):198-203.
  - Albain KS, Rusch VW, Crowley JJ. *Concurrent Cisplatin/Etoposide plus chest radiotherapy followed by surgery for stages IIIA(N2) and IIIB non-small-cell lung cancer : mature results of Southwest Oncology Group Phase II Study 8805*. *J Clin Oncol* 1995;13:1880-902.
  - Weiden PL, Piantodosi S. *Preoperative chemotherapy (cisplatin and fluorouracil) and radiation therapy in stage III non-small-cell lung cancer: a phase II study of the Lung Cancer Study Group*. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:266-72.
  - Tomlinson RH, Gray LH. *The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy*. *Br J Cancer* 1955;9:539-45.
  - Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT. *Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation*. *Cancer Res* 1995;55:369-75.
  - Folkman J, Klagsbrun M. *Angiogenic factors*. *Science* 1987 23;235:442-7.
  - Crawford HC, Matrisian LM. *Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinase and their role in tumor progression*. *Invasion Metastasis* 1994-95; 14:234-45.
  - Kartner N, Riordan JR, Ling V. *Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines*. *Science* 1983;221:1285-8.
  - Del Vecchio S, Ciarmiello A, Salvatore M. *Clinical imaging of multi-drug resistance in cancer*. *Q J Nucl Med* 1999;43(2):125-31.
  - Ferte J. *Analysis of the tangled relationships between P glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane*. *Eur J Biochem* 2000;267(2): 277-94.
  - Osmak M. *Molecular alterations induced in drug-resistant cells*. *Radiol Oncol* 1998;32:19-33.
  - Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson W. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. *Cell* 1991;64:327-36.
  - Mitsumoto M, Kamura T, Kobayashi H, et al. *Emergence of higher levels of invasive and metastatic properties in the drug resistant cancer cell lines after the repeated administration of cisplatin in tumor-bearing mice*. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124(11):607-14.
  - Osmak M, Niksic D, Brozovic A, et al. *Drug resistant tumor cells have increased levels of tumor markers for invasion and metastasis*. *Anticancer Res* 1999;19: 3193-8.



**=국문초록=**

**배경:** Cisplatin과 같은 세포독성 약제에 대한 내성은 폐암 치료 실패의 중요한 원인이다. 이러한 항암제에 대한 내성의 발생기전은 복잡하고 아직 완전히 알려져 있지 않지만 불량한 예후의 원인으로 생각된다. 특히 약제 내성이 발생한 환자의 경우 기존의 종양의 급속한 성장뿐 아니라 새로운 전이 병소가 급속히 발생 및 진단됨은 약제 내성을 가진 종양이 전이에의 용이성을 획득하는게 아닌가 의심케한다. 이를 규명하기 위해 Cisplatin에 내성을 지닌 비소세포폐암 세포주 H460/CIS의 전이 능력을 Cisplatin에 민감한 비소세포폐암 세포주 H460과 비교하고자 하였다. **대상 및 방법:** 약제 내성 세포주를 확보하기 위하여 H460세포에 cisplatin을 점차적으로 증가시켜 처리한 후 배양하였다. H460세포와 H460/CIS 세포에서의 혈관신생인자와 성장관련인자의 발현양상, gelatin zymography 분석, 그리고 in vivo 실험으로 nude 마우스에서의 자발적 전이능력의 차이를 비교하였다. **결과:** H460세포를 이식한 마우스의 폐에서는 종양이 형성되지 않았으나 H460/CIS세포를 이식한 마우스 10마리중 8마리에서 종양이 형성되었다. 또한 H460/CIS 세포주에서 전이 관련 유전자로 알려진 angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, matrix metalloproteinase 2 등이 더 발현되었고, 전이의 침습성을 유발하는 gelatinase의 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다. **결론:** 본 연구 결과를 통해 cisplatin에 내성을 가진 비소세포폐암세포에서 전이 능력이 증가될 수 있다고 여겨지며 이러한 사실을 토대로 초기 비소세포폐암 환자의 수술 전 항암약물요법의 타당성에 대해서 이야기하기 위해서는 많은 임상적 연구가 필요하리라 생각된다.

- 중심 단어:** 1. 비소세포폐암  
2. 내성  
3. cisplatin  
4. 전이