

*In vitro*에서 chitosan이 항암제의 세포독성에 미치는 영향

민 순 흥, 표 명 윤*

숙명여자대학교 약학대학

Effects of Chitosan on the Cytotoxicity of Anticancer Drugs *in vitro*

Soon-Hong Min and Myoung-Yun Pyo*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT

Chitosan is a depolymerized and partially deacetylated derivative of chitin. We investigated the cytotoxicity of chitosan in cancer cell lines, such as P388, L1210, HCT-15, SK-HepG-1 and mouse splenocytes as a normal cell by MTT assay. To clarify whether chitosan enhances cytotoxicity of anticancer drugs, we also examined the cytotoxicity of combined treatment with chitosan and anticancer drugs, such as cisplatin, mitomycin C, and 5-fluorouracil in cancer cell lines *in vitro*. Chitosan (37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 112.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed concentration-dependent cytotoxicity in the cancer cell lines. In addition, chitosan showed relatively lower cytotoxicity in normal cells than in the cancer cell lines. Particularly, this trend was significant at high doses of chitosan, i.e. 112.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Thus, these results suggest that chitosan may selectively induce the growth inhibition in cancer cell lines, compared to normal cells. Furthermore, the co-treatment of chitosan and anticancer drugs exhibited an apparant synergistic cytotoxicity in murine lymphoma cell lines, i.e. P388 and L1210 at 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of chitosan rather than at 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of chitosan, but such phenomenon could not be observed in solid tumor cell lines, i.e. HCT-15 and SK-HepG-1. However, chitosan did't reduced the cytotoxicity against normal mouse splenocytes induced by anticancer drugs. Therefore, it is concluded that the combination of chitosan and anticancer drugs might be useful for the cancer chemotherapy.

Key words : chitosan, anticancer drugs, mouse splenocytes, cancer cell lines, MTT assay

서 론

Chitosan (D-glucosamine β -(1, 4)-polymer)은 계, 새우 등의 갑각류나 버섯, 곰팡이 등의 식물류, 또

는 곤충의 껍질 중에 포함되어 있는 chitin (N-acetyl-D-glucosamine β -(1, 4)-polymer)의 부분적 탈아세틸화물로 여러 가지 다양한 생리활성을 보이는 polysaccharide 중의 하나이다. Chitosan과 그 여러 유도체들은 생체에 독성이 적으며 (Arai *et al.*, 1968), 대식세포를 활성화시키고 (Peluso *et al.*, 1994), 면역기능 조절작용 (Nishimura *et al.*, 1984;

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-710-9573, E-mail: mypyo@sm.ac.kr

Pyo and Kwak, 2002), 항암효과(Qi and Xu, 2006) 및 항암제로 유발되는 부작용 감소(Kimura and Okuda, 1999; Kimura *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2001), 화상 등의 상처 치료효과(Jin *et al.*, 2007), 간기능개선(Santhosh *et al.*, 2006), 항폐양작용(Anandan *et al.*, 2004), 항염증작용(Yoon *et al.*, 2007), 항산화작용(Jeon *et al.*, 2003; Koryagin *et al.*, 2006) 등이 보고되어 있다. 이와 같이 chitosan과 그 유도체에 대하여 여러 생리작용이 있다고 알려져 생체재료, 건강기능식품 등으로 널리 이용되고 있다.

최근 국민들의 식생활 및 생활양상의 변화에 따라 암환자의 수는 계속하여 급격히 증가하고 있는 추세이며, 이러한 질환의 치료제로써 다양한 항암제가 연구 개발되어 사용되어지고 있다. 그러나, 현재 사용되고 있는 대부분의 항암제는 그 비선택적인 독성으로 인하여 암세포뿐만이 아니라 정상세포에도 똑같은 독성을 발현하여 많은 부작용을 나타내어 장기치료에 어려움을 주고 있다. 따라서, 암세포에 대해서는 항암제의 세포독성을 증가시키거나 그 독성을 유지시켜주는 범위 내에서 정상세포에 대한 항암제의 독성을 감소시켜줄 뿐 아니라 내성을 저지시키는 물질을 개발하는 연구가 이루어지고 있다(Ahn *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993; Hirose *et al.*, 2007).

본 연구에서는 *in vitro*에서 암세포주인 L1210, P388, HCT-15, SK-HepG-1세포주와 정상세포인 마우스 비장세포에 대하여 chitosan을 단독 또는 항암제(cisplatin, mitomycin C, 5-fluorouracil)와 병용 처리하여 chitosan의 암세포 증식억제효과 및 항암제의 세포독성에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 실험에 사용한 RPMI medium 1640 powder, HEPES, fetal bovine serum (FBS), antibiotic & antimycotic agent, trypsin-EDTA는 Gibco제품을, Dimethylsulfoxide (DMSO)는 Junsei제품을, cisplatin, 5-fluorouracil (5-FU), [3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma제품을, mitomycin C는 한국유나이티드 제품을, 그 외의

시약은 세포배양용 및 특급을 구입하여 사용하였다.

기기는 CO₂ incubator (New Brunswick Scientific Co.), UV/VIS Spectrophotometer (Hitach Model 200-20), Microtiter plate reader (Spectrophotometer, Dynatech MR5000)를 사용하였다.

2. 시료의 조제

Chitosan powder를 mixer로 혼화하면서 1% acetic acid에 용해시키고 5 N NaOH용액으로 pH를 6.8~7.0으로 조정하였다. 이 시료를 1% DMSO 용액으로 300 µg/mL, 225 µg/mL, 150 µg/mL, 75 µg/mL이 되도록 용시조제하여 여과한 후, microplate의 well당 100 µL를 가하여 최종농도가 150 µg/mL, 112.5 µg/mL, 75 µg/mL, 37.5 µg/mL이 되도록 하였다. 항암제는 1% DMSO에 용시 용해하여 여과한 후 실험에 사용하였다.

3. 암세포주 및 배양

연세대 의대로부터 분양받은 P388세포주와 한국세포주은행으로부터 분양받은 L1210세포주는 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 tissue culture flask를 사용하여 RPMI 1640 배양액(RPMI 1640 powder, HEPES, L-glutamin, antibiotic-antimycotic agent, 10% FBS)으로 3~4회 계대배양하여 logarithmic phase에 도달한 세포를 실험에 사용하였다.

한국세포주은행으로부터 분양받은 HCT-15세포주와 SK-HepG-1세포주는 RPMI 1640 배양액으로 2~3회 계대배양하였으며, tissue culture flask 기벽에 부착한 세포를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 분리하였다.

4. 마우스의 비장세포 부유액 조제

4~6주령 암컷 ICR계 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 배지액이 담긴 용기에 넣고 teflon pestle를 이용하여 200 mesh stainless steel sieve를 통과시켜 단일세포액으로 만들고, RBC lysis buffer용액으로 적혈구를 용혈시켜 제거한 후 trypan blue exclusion method (Mishell and shiigi, 1980)로 2×10^6 cells/mL이 되도록 비장세포 부유액을 만들었다.

5. 세포독성 측정

본 연구에서는 chitosan을 *in vitro*에서 마우스와 사람의 암세포주에 처리시 나타나는 세포독성을 Mosmann법 (Mosmann, 1983)을 약간 변형한 MTT assay로 측정하였다. 즉, 실험하고자 하는 부유세포주(L1210, P388)와 마우스의 비장세포의 경우에는 세포배양액을 원심분리하고(1,000 rpm, 10 min, 4°C), 부착세포주 (HCT-15, SK-HepG-1)의 경우에는 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 배양기의 부착면으로부터 분리시킨 다음에 원심분리한 후, trypan blue exclusion method로 예비 실험에서 결정된 적정수의 세포농도(2×10^6 cells/mL)로 보정하였다. 암세포 현탁액을 96well microplate의 각 well에 100 µL씩 가한 후, 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 30분 동안 안정화시킨 후에 농도별로 시료용액을 각 well에 100 µL씩 넣어 실험군으로 하고, 배지액 100 µL씩 가한 것을 대조군으로 하였다. 마우스의 비장세포 부유액은 24well plate의 각 well에 1 mL씩 가하고 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 30분 동안 안정화시킨 후에 농도별로 시료용액을 각 well에 1 mL 넣어 실험군으로 하고, 배양액 1 mL씩 가한 것을 대조군으로 하였다. 48시간 배양후 MTT 용액을 well당 50 µL (24 well plate에는 500 µL)씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. DMSO 원액을 well당 50 µL (24 well plate에는 500 µL)씩을 가하여 30분간 진탕하면서 formazan을 완전히 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 흡광도(570 nm)를 측정하였다. 이 때, 실험군과 대조군은 2 well에 동일하게 시행하였으며, 동일 실험을 3회 실시하였다.

생성된 formazan의 양은 well중의 생존 세포수와 정비례하므로 실험군에서의 시료액의 농도별 평균 OD값과 대조군의 평균 OD값을 구해 아래의 식에서와 같이 세포독성(%)을 산출하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Mean of OD in experimental group}}{\text{Mean of OD in control group}} \right) \times 100$$

7. 통계학적 처리

동일한 실험을 3회 실시하고 각 실험군의 세포독성(%) 측정값의 평균과 표준편차를 산출하였다.

결과 및 고찰

1. Chitosan의 암세포주 및 정상세포에 대한 세포독성

Chitosan을 4종의 암세포주(P388, L1210, HCT-15, SK-HepG-1)와 마우스의 비장세포에 농도별(37.5, 75, 112.5, 150 µg/mL)로 처리하여 MTT assay로 세포독성을 측정된 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

Chitosan의 P388 암세포주에 대한 세포독성이 37.5 µg/mL에서는 14.3%, 75 µg/mL에서는 30.0%, 112.5 µg/mL에서는 72.3%, 150 µg/mL에서는 87.6%로 나타나 용량이 증가됨에 따라 P388 암세포주에 대한 세포독성이 증가되었고, L1210, HCT-15, SK-HepG-1 암세포주에 대해서도 이와 같은 세포독성을 나타내었다. 정상세포인 마우스 비장세포에 대해서는 chitosan의 농도가 증가됨에 따라 세포독성도 증가되는 현상을 보였으나 동일한 농도에서 암세포주에 대한 세포독성에 비해 낮은 세포독성을 나타내었다. 그러므로, chitosan은 농도의존적인 암세포 증식억제작용을 나타내고, 특히 고농도에서 암세포주에 대한 세포독성에 비해 정상세포인 마우스 비장세포에 대해서는 낮은 세포독성을 나타내었다.

2. Chitosan이 암세포주에 대한 cisplatin의 세포독성에 미치는 효과

Chitosan이 cisplatin의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 4종의 암세포주와 마우스의 비장세포에 cisplatin을 농도별로 단독처리 또는 chitosan과 병용처리한 실험결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

Cisplatin 1.5 µg/mL의 농도에서는 모든 세포주에 대해서 약 10~16% 정도의 독성을 나타내었으나, 15µg/mL의 농도에서는 HCT-15와 SK-HepG-1에 대해서 각각 58.0%와 49.0%의 높은 독성을 나타내었고, P388과 L1210에서는 이보다 낮은 25.7%와 29.2%의 독성을 나타내었다. 정상세포인 마우스 비장세포에도 1.5 µg/mL와 15 µg/mL의 농도에서 각각 14.0%와 38.7%의 세포독성을 보여 암세포주에 대한 세포독성과 비슷하였다.

Table 1. The cytotoxicity (%) of chitosan against cancer cell lines and mouse splenocytes

Exp. group ($\mu\text{g/mL}$)	P 388	L1210	HCT-15	SK-HepG1	Mouse splenocytes
CH 37.5	14.3 \pm 1.0	12.3 \pm 2.4	13.0 \pm 4.9	27.5 \pm 4.1	12.6 \pm 2.3
CH 75	30.0 \pm 1.9	25.5 \pm 0.7	34.3 \pm 8.7	40.7 \pm 3.1	27.8 \pm 4.7
CH 112.5	72.3 \pm 7.6	73.3 \pm 5.7	77.0 \pm 5.2	77.0 \pm 3.5	39.0 \pm 6.6
CH 150	87.6 \pm 4.1	84.6 \pm 4.5	88.7 \pm 2.5	88.7 \pm 1.5	43.7 \pm 6.0

Cancer cell lines and mouse splenocytes were seeded in 10% FBS-supplemented RPMI 1640 medium at 2×10^6 cells/mL and exposed to various concentration of chitosan (CH: 37.5, 75, 112.5, 150 $\mu\text{g/mL}$). After 48h culture, cell survival was determined by MTT assay and absorbance (O.D.) was measured at 570 nm with microplate reader. Cytotoxicity was expressed as the relative percentage (%) as compared with untreated control. Each value is the mean \pm S.D. of three separate experiments (duplicate for each experiment)

Table 2. Effect of chitosan on cytotoxicity (%) of cisplatin against cancer cell lines and mouse splenocytes

Exp. group ($\mu\text{g/mL}$)	P 388	L1210	HCT-15	SK-HepG1	Mouse splenocytes
CIS 1.5	11.7 \pm 4.2	10.0 \pm 6.4	11.5 \pm 2.1	16.0 \pm 2.9	14.0 \pm 9.9
CIS 15	25.7 \pm 5.9	29.2 \pm 7.8	58.0 \pm 0.6	49.0 \pm 7.2	38.7 \pm 6.4
CH 37.5	14.3 \pm 1.0	12.3 \pm 2.4	13.0 \pm 4.9	27.5 \pm 4.1	12.6 \pm 2.3
CH 75	30.0 \pm 1.9	25.5 \pm 8.7	34.3 \pm 8.7	40.7 \pm 3.1	27.8 \pm 4.7
CIS 1.5+CH 37.5	37.8 \pm 5.3	32.4 \pm 4.3	33.5 \pm 6.4	42.0 \pm 8.8	26.3 \pm 6.4
CIS 1.5 +CH 75	68.3 \pm 2.2	64.8 \pm 7.8	51.0 \pm 6.0	61.3 \pm 7.1	49.0 \pm 3.6
CIS 15+CH 37.5	45.3 \pm 4.3	55.0 \pm 11.0	41.0 \pm 1.7	46.7 \pm 7.0	49.0 \pm 8.5
CIS 15+CH 75	65.0 \pm 7.0	66.3 \pm 3.7	63.0 \pm 5.3	70.3 \pm 6.1	62.0 \pm 7.0

Cell lines were exposed to cisplatin (CIS) alone or combination of chitosan (CH). Other legends and methods are the same those as described in Table 1

Chitosan을 cisplatin과 병용처리하여 chitosan이 cisplatin의 세포독성에 미치는 영향을 Table 2에서 보면, P388 암세포주에 저농도인 cisplatin 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 병용처리시의 세포독성이 각각 37.8%, 68.3%인데, cisplatin 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리시의 세포독성과 chitosan 단독처리시의 세포독성을 합한 값은 각각 26.0%와 41.7%이었다. 그러므로, chitosan을 cisplatin과 병용처리시 암세포주에 대한 세포독성의 상승효과가 나타났다고 볼 수 있다. 그러나, 고농도인 cisplatin 15 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 병용처리시의 세포독성은 각각 45.3%와 65.0%으로 단독처리시의 세포독성을 합한 값(40, 55.7%)보다 약간 높은 정도의 독성을 보여 저농도의 cisplatin에 병용처리할 때 확실한 상승효과를 나타내었다. L1210 암세포주에 대해서도 이러한 현상이 나타났다. 그러나, HCT-15 암세포주에 저농도인 cisplatin 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 병용처리시의 세포독성이 각각 33.5%, 51.0%이며, cisplatin 15 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리시의 세포독성과 chitosan 단독처리시의 세포독

성을 합한 값은 각각 24.5%와 45.8%으로 독성작용에 큰 변화가 없었고, 고농도인 cisplatin 15 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 병용처리시의 세포독성은 각각 41.0%와 63.0%으로 단독처리시의 세포독성을 합한 값(71%, 92%)보다 현저히 낮아져 고농도의 cisplatin에 chitosan을 병용처리할 때에는 오히려 암세포주에 대한 세포독성이 감소되었다. SK-HepG-1 암세포주에 대해서도 이러한 감소현상이 나타났다. 정상세포인 마우스 비장세포에 cisplatin과 chitosan을 농도별로 병용처리시의 세포독성이 각각 단독처리시의 세포독성을 합한 값과 비슷하여 cisplatin의 정상세포에 대한 세포독성을 감소시키지는 못하는 것으로 보인다.

3. Chitosan이 암세포주에 대한 mitomycin C의 세포독성에 미치는 효과

Chitosan이 mitomycin C (MMC)의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, MMC를 농도별로 단독처리 또는 chitosan과 병용처리한 실험결과를 Table 3에서 보는 바와 같다.

Table 3. Effect of chitosan on cytotoxicity (%) of mitomycin C against cancer cell lines and mouse splenocytes

Exp. group ($\mu\text{g/mL}$)	P 388	L1210	HCT-15	SK-HepG1	Mouse splenocytes
MMC 0.5	27.0 \pm 6.8	17.7 \pm 10.6	49.0 \pm 2.8	36.5 \pm 0.7	9.0 \pm 2.2
MMC 1.0	42.9 \pm 2.4	42.0 \pm 2.6	57.5 \pm 0.7	40.8 \pm 1.5	26.6 \pm 0.9
CH 37.5	14.3 \pm 1.0	12.3 \pm 2.4	13.0 \pm 4.9	27.5 \pm 4.1	12.6 \pm 2.3
CH 75	30.0 \pm 1.9	25.5 \pm 8.7	34.3 \pm 8.7	40.7 \pm 3.1	27.8 \pm 4.7
MMC0.5+CH 37.5	58.0 \pm 3.6	41.3 \pm 2.3	46.7 \pm 2.1	53.0 \pm 4.2	38.7 \pm 6.1
MMC0.5+CH 75	65.2 \pm 2.5	70.3 \pm 4.6	56.3 \pm 4.2	56.0 \pm 4.6	42.0 \pm 3.6
MMC1.0+CH 37.5	59.2 \pm 9.4	51.0 \pm 3.6	55.3 \pm 3.2	55.0 \pm 3.6	46.3 \pm 4.7
MMC1.0+CH 75	64.2 \pm 9.1	75.7 \pm 3.1	62.3 \pm 7.1	58.7 \pm 4.9	60.8 \pm 3.9

Cell lines were exposed to mitomycin C (MMC) alone or combination of chitosan (CH). Other legends and methods are the same those as described in Table 1

MMC 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 임파종 세포주인 P388 (27.0%), L1210 (17.7%)보다 고형암 세포주인 HCT-15 (49.0%)와 SK-HepG-1 (36.5%)에 대해 더 높은 세포독성을 보여 주었다. 그러나 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 HCT-15와 SK-HepG-1에 대해서 각각 57.5%와 40.8%의 높은 독성을 나타내었고, P388과 L1210에서도 약 42%의 독성을 나타내어 큰 차이는 없었다. 마우스 비장세포에 대해서는 같은 농도에서 암세포주에 비해 낮은 세포독성을 나타내어 chitosan과 비슷한 경향을 보였다.

Chitosan을 MMC와 병용처리하여 chitosan이 MMC의 세포독성에 미치는 영향을 Table 3에서 보면, P388 암세포주에 MMC 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 병용처리시의 세포독성이 각각 58.0%, 65.2%이며, MMC 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리시의 세포독성과 chitosan 단독처리시의 세포독성을 합한 값은 각각 41.3%와 57.0%이었다. 그러므로, chitosan을 MMC와 병용처리시 암세포주에 대한 세포독성이 약간 상승되는 경향을 보였다. 그러나, 고농도인 MMC 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 병용처리시의 세포독성은 각각 59.2%와 64.2%로 단독처리시의 세포독성을 합한 값(57.2%, 72.9%)과 거의 비슷하여 고농도의 MMC에 chitosan을 병용처리할 경우에는 상승효과를 나타내지 않았다. L1210 암세포주에 대해서도 이러한 현상이 나타났다. 그러나, HCT-15 암세포주에 저농도인 MMC 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 병용처리시의 세포독성이 각각 46.7%, 56.3%이며, MMC 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리시의 세포독성과 chitosan 단독처리시의 세포독성을 합한 값은 각각

62%와 83.3%로 병용처리시의 세포독성작용이 현저히 저하되었다. MMC 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 이러한 현상이 나타나 chitosan을 병용처리할 경우에 오히려 암세포주에 대한 세포독성이 감소되었다. SK-HepG-1 암세포주에 대해서도 동일한 현상이 나타났다.

임파종 세포주인 P388, L1210에 대해서는 모든 농도의 병용처리에서 Song 등이 (Song *et al.*, 1993) *in vivo*에서 마우스 종양에 대하여 N-succinyl-chitosan-mitomycin C conjugate와 carboxymethyl-chitin-mitomycin C conjugate를 이용하여 항암효과를 보고한 논문과 유사한 결과인 세포독성의 상승효과를 나타내었다. 그러나, 고형암 세포주인 HCT-15과 SK-HepG-1에서는 chitosan이 MMC의 세포독성을 감소시켰으며, 이러한 결과는 고형암의 경우 병용처리시 상승효과 관찰률이 높지 않다는 Roh 등 (Roh *et al.*, 1991)의 보고와 유사하였다.

또한, 정상세포인 마우스 비장세포에 MMC와 chitosan을 농도별로 병용처리시의 세포독성이 각각 단독처리시의 세포독성을 합한 값과 비슷한 상승작용이 나타나 MMC의 정상세포에 대한 세포독성이 감소되지 않았다.

4. Chitosan이 암세포주에 대한 5-fluorouracil의 세포독성에 미치는 효과

Chitosan이 5-fluorouracil (5-FU)의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 4종의 암세포주와 마우스의 비장세포에 5-FU를 농도별로 단독처리 또는 chitosan과 병용처리한 실험결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

Table 4. Effect of chitosan on cytotoxicity (%) of 5-fluorouracil against cancer cell lines and mouse splenocytes

Exp. group ($\mu\text{g/mL}$)	P 388	L1210	HCT-15	SK-HepG1	Mouse splenocytes
FU 0.31	19.9 \pm 2.0	26.7 \pm 3.5	26.7 \pm 3.5	39.5 \pm 2.1	12.2 \pm 6.6
FU 1.25	40.8 \pm 1.3	43.7 \pm 2.1	40.3 \pm 4.2	48.0 \pm 1.7	24.0 \pm 4.8
CH 37.5	14.3 \pm 1.0	12.3 \pm 2.4	13.0 \pm 4.9	27.5 \pm 4.1	12.6 \pm 2.3
CH 75	30.0 \pm 1.9	25.5 \pm 8.7	34.3 \pm 8.7	40.7 \pm 3.1	27.8 \pm 4.7
FU0.31+CH 37.5	66.3 \pm 1.3	56.0 \pm 1.7	47.0 \pm 2.6	48.0 \pm 4.4	47.3 \pm 2.5
FU0.31+CH 75	72.5 \pm 3.0	60.7 \pm 4.0	66.0 \pm 1.0	67.0 \pm 1.7	50.0 \pm 5.7
FU1.25+CH 37.5	61.0 \pm 1.4	58.0 \pm 3.6	53.0 \pm 5.3	53.7 \pm 4.5	51.0 \pm 6.0
FU1.25+CH 75	72.0 \pm 1.6	68.0 \pm 1.4	67.7 \pm 3.8	65.7 \pm 3.8	59.2 \pm 6.4

Cell lines were exposed to 5-fluorouracil (5-FU) alone or combination of chitosan (CH). Other legends and methods are the same those as described in Table 1

5-FU 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 P388 (19.9%), L1210 (26.7%), HCT-15 (26.7%)보다 SK-HepG-1 (39.5%)에 대해 약간 더 높은 세포독성을 나타내었고, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 모든 암세포주에 대해서 약 40~48% 정도의 독성을 보였다. MMC와 마찬가지로 마우스 비장세포에 대해서는 같은 농도에서 암세포주에 비해 비교적 낮은 세포독성을 나타내었다.

Chitosan을 5-FU와 병용처리하여 chitosan이 5-FU의 세포독성에 미치는 영향을 Table 4에서 보면, P388 암세포주에 5-FU 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 병용처리시의 세포독성이 각각 66.3%, 72.5%이며, 5-FU 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리시의 세포독성과 chitosan 단독처리시의 세포독성을 합한 값은 각각 34.2%와 48.9%이었다. 그러므로, chitosan을 5-FU와 병용처리시 암세포주에 대한 세포독성의 상승효과가 현저히 나타났다. 그러나, 고농도인 5-FU 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 병용처리시의 세포독성은 각각 61.0%와 72.0%로 단독처리시의 세포독성을 합한 값(55.1%, 70.8%)과 거의 비슷하여 고농도의 5-FU에 chitosan을 병용처리 할 경우에는 상승효과는 나타나지 않았고 상가작용이 보였다. L1210 암세포주에 대해서도 이와 유사한 현상이 나타났다. 그러나, HCT-15 암세포주에 저농도인 5-FU 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 와 chitosan을 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 또는 75 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 병용처리시의 세포독성이 각각 47.0%, 66.0%이며, 5-FU 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리시의 세포독성과 chitosan 단독처리시의 세포독성을 합한 값은 각각 39.7%와 61%로 병용처리시의 세포독성작용이 크게 변화하지 않았으며, 5-FU

1.25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 유사하였다. 그러나, SK-HepG-1 암세포주에 대해서는 5-FU의 농도에 무관하게 chitosan의 병용처리로 세포독성이 현저히 저하되었다.

또한, 정상세포인 마우스 비장세포에 5-FU와 chitosan을 농도별로 병용처리시의 세포독성이 각각 단독처리시의 세포독성을 합한 값보다 높아져 정상세포에 대한 세포독성이 chitosan 병용처리로 증가되는 것으로 보인다.

결론

Chitosan을 4종의 암세포주(P388, L1210, HCT-15, SK-HepG-1)와 마우스의 비장세포에 단독처리 및 3종의 항암제(cisplatin, mitomycin C, 5-fluorouracil)에 병용처리하여 MTT assay로 세포독성을 측정된 결과, chitosan은 농도의존적인 암세포 증식 억제작용을 보였으며, 정상세포인 마우스 비장세포에 대해서도 농도의존적인 세포독성을 나타내었으나 암세포주에 대한 세포독성에 비해 낮은 세포독성을 보였다. Chitosan을 항암제와 병용처리한 경우, 임파종 세포주인 P388과 L1210에 대한 세포독성의 상승효과가 나타났으며, 이러한 상승효과는 항암제의 고농도보다 저농도의 병용처리시 더욱 현저하였다. 그러나, chitosan을 고농도의 항암제와 병용처리시에는 고탄압 세포주인 HCT-15, SK-HepG-1에 대한 세포독성이 오히려 저하되었다. 또한, chitosan을 항암제와 병용처리시 정상세포인 마우스 비장세포에 대한 항암제의 독성은 감소되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 숙명여자대학교 약학연구소 특별연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Ahn BZ, Lee YH and Kim SI. Isolation of cytotoxicity potentiating substances from red ginseng, *J of Korean Cancer Association* 1992; 24: 795-806.
- Anandan R, Nair PGV and Mathew S. Anti-ulcerogenic effect of chitin and chitosan on mucosal antioxidant defence system in HCl-ethanol-induced ulcer in rats, *J Pharmacol* 2004; 56 (2): 265-269.
- Arai K, Kinumaki T and Fugita T. Toxicity of chitosan, *Bull Tokai Reg Fish Lab* 1968; 43: 89-94.
- Hirose A, Sato E, Fujii H, Sun B, Nishioka H and Aruom OI. The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice, *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; in press
- Jeon TI, Hwang SG, Park NG, Jung YR, Shin SI, Choi SD and Park DK. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats, *Toxicology* 2003; 187: 67-73.
- Jin Y, Ling PX, He YL and Zhang TM. Effects of chitosan and heparin on early extention of burns, *Burns* 2007; in press
- Kim JH, Kim BS, Choi JJ, Kim KM, Yoo NC, Choi JH, Lim HY, Roh JK, Lee KS and Kim BS. Effects of verapamil, tamoxifen and cyclosporin A for the modulation of multidrug resistance in human lung cancer cell lines, *J of Korean Cancer Association* 1993; 25: 225-235.
- Kimura Y and Okuda H. Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity and immunocompetent oragnic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice, *Jpn J Cancer Res* 1999; 90 (7): 765-774.
- Kimura Y, Onoyama M, Sera T and Okuda H. Antitumor activity and side effects of combined treatment with chitosan and cisplatin in sarcoma 180-bearing mice, *J Pharm Pharmacol* 2000; 52 (7): 883-890.
- Kimura Y, Sawai N and Okuda H. Antitumor activity and adverse reaction of combined treatment with chitosan and doxorubicin in tumour-bearing mice, *J Pharm Pharmacol* 2001; 53 (10): 1378-1378.
- Koriagin AS, Erofeeva EA, Yakimovich NO, Aleksandrova EA, Smirnova LA and Mal'kov AV. Analysis of antioxidant properties of chitosan and its oligomers, *Bull Exp Biol Med* 2006; 142(4): 461-463.
- Mischell BB and Shiigi SM. Selected methods in cellular immunology, W.H. Freeman and company 1980; 16-17.
- Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Applicational to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J Immunol Method* 1983; 65: 55-63.
- Nishimura K, Nishimura S and Azuma I. Immunological activity of chitin and its derivatives, *Vaccine* 1984; 2: 93-99.
- Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosio L, Calabro D, Avallone B. and Balsamo G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function, *Biomaterials* 1994; 15: 1215-1220.
- Pyo MY and Kwak YH. Effects of chitosan on the normal and cyclophosphamide-suppressed primary humoral immune response in mice, *Yakhak Hoeji* 2002; 46(2): 120-123.
- Qi L and Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles, *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 4243-4245.
- Roh JK, Chung HC, Koh EH, Lee WY, Hahn JS and Kim BS. In vitro cytotoxicity of various anticancer drugs to short-term cultured gastric adenocarcinoma cell lines, *J. of Korean Cancer Association* 1991; 23: 3.
- Santhosh S, Sini TK, Anandan R and Mathew PT. Effect of chitosan supplementation on antitubercular drugs-induced hepatotoxicity in rats, *Toxicology* 2006; 219: 53-59.
- Song Y, Onishi H and Nagai T. Pharmacokinetics characteristics and antitumor activity of the N-succinyl-chitosan-mitomycin C conjugate and the carboxymethyl-chitin-mitomycin C conjugate, *Biol Pharm Bull* 1993; 16 (1): 48-54.
- Yoon HJ, Moon ME, Park HS, Im SY and Kim YH. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells, *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 954-959.