



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

醫學 碩士學位 論文

항암제 함유 골시멘트에서 유리되는  
아드리아마이신의 세포독성  
(국소 항암 요법에 대한 가능성)

아주대학교 대학원

의 학 과

장 동 욱

항암제 함유 콜시멘트에서 유리되는  
아드리아마이신의 세포독성  
(국소 항암 요법에 대한 가능성)

지도교수 김 병 석

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

1999 년 12 월

아주대학교 대학원

의 학 과

장 동 욱

장동욱의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

아주대학교 대학원

1999년 12월 일

## 감사의 글

이 논문을 완성함에 있어 세심한 배려와 격려로 지도하여 주신 김병석 교수님께 무한한 감사를 드리며, 논문 심사중 훌륭한 지적과 방향을 잡아 주신 해부병리학교실 이기범 교수님, 유전학교실 하만준 교수님, 정형외과학교실 이동신 박사님, 예방의학교실 전기홍 교수님, 이순영 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

항상 오늘이 있기까지 크신 사랑으로 돌보아 주신 아주대학교 의과대학 정형외과학교실에 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

## 항암제 함유 골시멘트에서 유리되는 아드리아마이신의 세포독성 (국소 항암 요법에 대한 가능성)

골육종 환자의 최신 치료법으로 술전 항암치료, 수술적 절제술, 술후 항암치료의 병용 요법이 가장 좋은 치료라고 알려져 있다. 여기에서 항암치료는 전신 투여 방법으로 치료하게 되는데, 골수 억제, 심장 독성, 점막염, 오심, 구토, 탈모 등의 합병증으로 항암제의 용량에 제한이 뒤따르게 된다. 또한 정형외과 영역에서는 종양의 절제술후 골 결손에 대하여 동종골이나 종양 대치물(tumor prosthesis)로 수술후 골시멘트를 이용하여 신체내에 고정을 실시하게 된다. 난치성 만성 골수염에서 괴사된 골조직을 제거하고 항생제를 함유한 골시멘트를 사용할 경우 함유된 항생제가 지속적으로 나와 만성 골수염을 치료하였다는 보고가 있다. 저자는 항암제 아드리아마이신(adriamycin)을 함유한 골시멘트를 사용할 경우 지속적으로 또는 간헐적으로 항암제가 용출될 경우 골육종 및 암환자의 치료에 도움을 줄 수 있으 것으로 사료되어, 실험실 연구(*in vitro*)를 계획하였다. 실험은 골시멘트의 모양에 따른 변화, 골시멘트를 배양할 경우 용매에 따른 변화, 사용된 골시멘트의 종류에 따른 변화, 함유된 항암제의 농도에 따른 변화 및 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 항암제의 세포 독성 실험을 실시하였다. 납작한 모양이 원주형 모양보다 아드리아마이신 용출이 많았고, 3%, 0.9%, 0.45% 식염수(saline)의 순서로 아드리아마이신 용출이 적었으며, ddH<sub>2</sub>O의 경우 거의 아드리아마이신이 용출되지 않았다. 사용된 골시멘트는 CMW 3, Simplex P가 Palacos R, LVC보다 아드리아마이신 용출이 많았고, 사용된 아드리아마이신의 농도에 따라 25mg, 5mg, 2.5mg의 순으로 아드리아마이신 용출량이 감소하였다. 세포 독성은 골육종 세포주 SaOS2를 이용하여 25mg, 5mg, 2.5mg의 아드리아마이신 함유 골시멘트 및 골시멘트(LVC)만의 배양에서 SaOS2만을 배양한 dish에서의 세포수를 100%로 볼 때, 각각 99%, 98%, 95%, 74%를 보여주었다. 저자는 아드리아마이신 함유 골시멘트가 아드리아마이신을 용출하여 골육종 세포주인 SaOS2의 세포 독성을 보여주어, 항암제 함유 골시멘트는 생체에 응용할 경우 정형외과 영역에서 국소 항암치료의 한 방법으로 사료되었다.

핵심단어 : 골육종 세포주, 골시멘트, 아드리아마이신, 세포 독성

# 차 례

논문인준서 .....	i
감사의 글 .....	ii
국문요약 .....	iii
차례 .....	iv
그림 차례 .....	v
사진 차례 .....	vi
표 차례 .....	vii
I. 서론 .....	1
II. 대상 및 방법 .....	2
A. 대상 .....	2
B. 방법 .....	3
1. 아드리아마이신 함유 골시멘트 pellets 제작 .....	3
2. 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 정도 .....	3
3. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 용매에 따른 아드리아마이신 용출 정도 .....	4
4. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출 정도 .....	4
5. 아드리아마이신 농도에 따른 아드리아마이신 함유 골시멘트의 아드리아마이신 용출 정도 .....	4
6. 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포독성 정도 .....	5
7. 결과 분석 및 통계 처리 .....	5
III. 결과 .....	6
1. 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 정도 .....	6
2. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 용매에 따른 아드리아마이신 용출 정도 .....	6
3. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출 정도 .....	6
4. 아드리아마이신 농도에 따른 아드리아마이신 함유 골시멘트의 아드리아마이신 용출 정도 .....	6
5. 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포독성 정도 .....	6
IV. 고찰 .....	19
V. 결론 .....	22
참고문헌 .....	23
영문초록 .....	25

## 그림 차례

그림 1. Adriamycin differences eluted from flat or cylindrical shape(2.5mg of adriamycin-impregnated Palacos R bone cement). .....	8
그림 2. Adriamycin differences eluted from adriamycin-impregnated Palacos R bone cement(2.5mg) under four different solutions(3%, 0.9%, 4.5% saline & ddH2O). .....	9
그림 3. Adriamycin concentration eluted from CMW 3 or Simplex P was higher than Palacos R or LVC. ....	10
그림 4. Adriamycin concentration eluted from 25mg of adriamycin-impregnated cement(per gram of LVC cement) was higher than 5mg or 2.5mg. ....	11



## 사진 차례

- 사진 1. 1A: 96 MicroWell plates(flat bottom, *Nunc*). 1B: 100mm culture dish(*Corning*) with a cylindrical Palacos R cement and 10ml of 0.9% normal saline. .... 12
- 사진 2. 2A: SaOS2( $7.5 \times 10^5$  cells) at initial culture. 2B: SaOS2 at 24 hours after initial culture. 2C: confluent cells of SaOS2( $238 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100).  
..... 13
- 사진 3. 3A: SaOS2 with LVC cement only at 24 hours after initial culture. 3B: more cellularity of SaOS2( $62 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100). .... 14
- 사진 4. 4A: The picture shows scanty cellularity of SaOS2, cultured with 2.5mg of adriamycin-impregnated LVC cement at 24 hours after initial culture(left: center, right: periphery). 4B: The picture shows scanty cellularity of SaOS2, cultured with 2.5mg of adriamycin-impregnated LVC cement ( $12.5 \times 10^4$  cells) and cellular shrinkage and cell death at 48 hours after initial culture(x100)(left: center, right: periphery). .... 15
- 사진 5. 5A: The picture shows scanty cellularity of SaOS2, cultured with 5mg of adriamycin-impregnated LVC cement at 24 hours after initial culture(left: center, right: periphery). 5B: The picture shows almost dead cells of SaOS2, cultured with 2.5mg of adriamycin-impregnated LVC cement ( $5.4 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100)(left: center, right: periphery). .... 16
- 사진 6. 6A: The picture shows almost dead cells of SaOS2, cultured with 25mg of adriamycin-impregnated LVC cement at 24 hours after initial culture(left: center, right: periphery). 6B: The picture shows all dead cells of SaOS2 with 25mg of adriamycin-impregnated LVC cement ( $1.6 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100)(left: center, right: periphery). .... 17

## 표 차례

표 1. Cellular viability of SaOS2 at 48 hours after initial culture. ....	18
--	----

# 항암제 함유 골시멘트에서 유리되는 아드리아마이신의 세포독성 (국소 항암 요법에 대한 가능성)

<지도 김병석 교수>

아주대학교 대학원 의학과

장 동 욱

## I. 서 론

최근 정형외과 영역에서 난치병으로까지 치부되는 만성 골수염의 정맥 주사 항생제 요법은 많은 치료 실패를 보고하였으나, 정상적인 조직을 포함하여 만성 골수염으로 발생된 골괴사된 부위 및 섬유조직이 형성된 부위를 절제하고, 항생제를 섞어 만든 골시멘트를 1cm 내외 크기의 염주로 만들어 골결손부위에 투여하여 만성 골수염 치료에 좋은 결과를 얻었다는 수많은 보고가 있으며, 최근에는 적절한 골절제술 후 항생제 함유 골시멘트 투여가 만성 골수염의 가장 적절한 치료 방법중의 하나로 알려져 있다. 이때 항생제가 함유된 골시멘트 주변으로 항생제를 지속적으로 방출한다고 알려져 있으며<sup>1)</sup>, 이런 새로운 약물전달체계(drug delivery system)는 그 정확한 기전은 모르나, 암환자에서 골시멘트에 적절한 항암제의 혼합체가 골시멘트와 항생제 혼합체와 유사한 약물전달체계를 유지한다면 좋은 국소 항암 치료법의 하나라고 사료된다. 문헌보고에 의하면 골시멘트와 항암제의 하나인 메토틀렉세이트(methotrexate)의 혼합체는 단기간일지라도 지속적으로 골시멘트에서 메토틀렉세이트를 방출한다는 보고<sup>4,8,11,15,16)</sup>가 있으나 메토틀렉세이트는 골유합에 지장을 준다는 보고가 있어, 정형외과 영역에서의 사용에 제한이 예견되고 있으나, 아드리아마이신(adriamycin: doxorubicin)<sup>15)</sup>에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 아드리아마이신에 대한 연구가 시도되어 실제 임상에 적용된다면 항암제로 인한 부작용은 최소화하고 항암제의 국소 투여로 병소의 국소 항암제 농도를 극대화하여 전신 항암제 투여로 인한 부작용은 최소화하고, 치료 효과는 극대화할 수 있는 치료 방법이 개발되어, 암환자의 치료에서 국소 치료법으로 최소한의 항암제로 최대한의 치료 효과를 얻을 수 있으리라 사료된다. 외국에서는 극히 일부에서 여

기에 대한 연구가 시작되었으나, 국내에서는 이에 대한 연구가 거의 없어 항암제 함유 골시멘트에서의 항암제 용출에 대한 연구가 시급한 실정이다. 이에 대한 연구의 첫단계로 아드리아마이신 함유 골시멘트 모델을 만들어 항암제인 아드리아마이신이 주변 환경의 변화에 대해 아드리아마이신 용출에 어떤 영향을 주는지, 단위 시간당 용출된 아드리아마이신의 양, 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출의 차이, 방출된 아드리아마이신의 골육종 암세포주(SaOS2)에서의 항암 효과 등에 관한 실험실(*in vitro*) 연구를 실시하여 항암제 함유 골시멘트가 새로운 약물전달체계의 하나일 가능성을 확인하여, 골육종 및 수많은 골로의 전이성 암 등의 새로운 치료법 개발에 기여하고자 본 연구를 시작하였다.

## II. 대상 및 방법

### A. 대상

사용된 골시멘트는 4종류는 Palacos R(*Schering-Plough*), LVC(low viscosity cement)(*Zimmer*), CMW 3(*DePuy*), Simpex P(*Howmedica*) 등의 4종류로 모두 항생제가 함유되지 않은 시멘트를 선택하여 실험에 사용되었다. 골시멘트의 구성 성분은 Palacos R 40g은 methyl methacrylate/methyl acrylate copolymer 38.8g, benzoyl peroxide 0.2g, zirconium dioxide 6.0g, chlorophyll 0.001g, LVC는 40g 중 methyl methacrylate monomer 97.25%, N,N-dimethyl-p-toluidine 2.75%, hydroquinone 75ppm, CMW 3는 40g 중 polymethyl methacrylate 88%, benzoyl peroxide 2%, barium sulphate 10%, Simpex P는 40g 중 methylmethacrylate-styrene-copolymer 75%, polymethyl methacrylate 15%, barium sulphate 10% 등으로 구성되어있으며, 거의 다 polymethylmethacrylate, barium sulphate 또는 zirconium dioxide, polymerization inhibitor로 구성된 분말과 methylmethacrylate monomer 및 activator로 구성된 액체로 조성되어 있다.

사용된 항암제는 독시루비신 하이드로클로라이드(Doxirubicin hydrochloride) (*Pharmacia Upjohn*)로 50mg(/vial) 분말을 사용하였으며, 사용된 항암제의 용량으로 골시멘트 그램 당 아드리아마이신 2.5mg, 5mg, 25mg이었다.

일정한 크기의 아드리아마이신 함유 골시멘트 pellets을 만들기 위하여 96 MicroWell Plates(*flat bottom, Nunc #167008*)을 주형(mold)으로 이용하여 0.33cm<sup>2</sup>x1cm 크기의 원주형(cylindrical shape)의 골시멘트 pellet을 만들었고, 아드리아마이신 함유 골시멘트 pellets에

서 용출되는 항암제 농도를 측정하기 위하여 사용된 용매로는 ddH<sub>2</sub>O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수(중외제약)을 사용하였으며, 이때 사용된 세포배양용 dish로는 100mm culture dishes(*Corning*)을 사용하였다.

## B. 방법

연구 방법으로 아드리아마이신 함유 골시멘트 pellets을 제작, 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 정도, 아드리아마이신 함유 골시멘트의 용매에 따른 아드리아마이신 용출 정도, 아드리아마이신 함유 골시멘트의 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출 정도, 아드리아마이신 농도에 따른 아드리아마이신 함유 골시멘트의 아드리아마이신 용출 정도, 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포독성 정도 등을 검증하기 위하여 실험 모델을 설정하였다.

### 1. 아드리아마이신 함유 골시멘트 pellets 제작

실험에 사용되는 골시멘트 pellet의 크기는 일정한 크기를 유지하고 실험의 정확도를 기하기 위하여 주형을 사용<sup>15)</sup>하였는데, 여기에서 사용되는 주형으로는 세포배양에 사용되는 배양면적(culture area) 0.33cm<sup>2</sup>×1cm인 96 MicroWell Plates를 이용하였고, 사용된 골시멘트는 Palacos R, LVC, CMW3, Simplex P를 각각 용도에 맞게 이용하였다. 사용된 항암제는 아드리아마이신을 이용하였고 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5mg, 5mg, 25mg(mg of adriamycin/ g of cement powder) 및 대조군으로 항암제가 섞이지 않은 골시멘트만의 pellets을 실온에서 적당하게 만든 후 methyl methacrylate monomer를 섞어 골시멘트가 굳기전에 96 MicroWell Plate의 각각의 well에 적당량을 넣어 약 10분간 굳힌다. 이때 얻어진 골시멘트 pellets은 농도별로 구분하여 각각의 pellets의 무게를 측정한 후 무균 상태로 각각 세포배양용 플라스크에 넣어 4<sup>0</sup>C 냉장고에 보관하였다(사진 1).

### 2. 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 정도

Palacos R 골시멘트와 항암제인 아드리아마이신을 섞어 사용할 때 골시멘트의 같은 용량 이더라도 모양에 따라 골시멘트에서 유리되는 항암제의 양을 상호 비교하기 위하여 원주형 모양(cylinder shape)의 골시멘트 pellets을 각각 3개씩 만들고, 다시 원주형 모양의 골시멘트를 굳기전에 같은 부피를 1mm 두께의 납작한 모양(flat shape)으로 만들어, 세포배양용 dish에 0.9% 생리식염수 10ml를 pipet한 후, 각각의 dish에 Palacos R 골시멘트 1g 당

2.5mg의 아드리아마이신의 농도로 만든 원주형 모양의 골시멘트 pellet 1개씩 3개의 dish에 각각 넣고 또한 납작한 모양의 골시멘트 pellet 1개씩 3개의 dish에 각각 넣어 1시간 간격으로 24시간 동안 1ml의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하고, 다시 2일째 부터는 매일 2주일 동안 1ml의 saline을 채취하여 microtube에 보관하여 spectrophotometry로 optic density를 구할때까지  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다. 이때 사용된 wave length는 490nm이었다.

### 3. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 용매에 따른 아드리아마이신 용출 정도

각각 3개씩의 세포배양용 dish(culture area:  $145\text{cm}^2$ , Nunc #168381)에 ddH<sub>2</sub>O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수를 각각 10ml 씩 pipet한 후, 각 dish에 Palcos R 골시멘트 1g에 2.5mg의 아드리아마이신을 넣어 만든 원주형 모양의 골시멘트 pellets을 각각 1개씩 넣고 이를 다시 3 sets로 만든후, 1시간 간격으로 1 ml의 용매를 채취하여 microtube에 보관하고, 다시 2일째 부터는 매일 2주일 동안 1ml의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하여, 항암제 농도를 spectrophotometry로 optic density를 구할때까지  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 냉동보관 하였다.

### 4. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출 정도

Palacos R, Low Viscosity Cement, CMW 3, Simplex P의 4 종류의 골시멘트를 각각 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5mg(2.5mg of adriamycin/ g of cement)을 실온에서 적당하게 섞은 후 methyl methacrylate monomer를 적당하게 혼합하여 만든 골시멘트 pellet을 세포배양용 dish에 각각 1개씩 넣은후 10ml의 0.9% 식염수를 각각 넣어 이를 다시 3 sets로 만들어, 1시간 간격으로 1 ml의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하고, 다시 2일째 부터는 매일 2주일 동안 1ml의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하여 항암제 농도를 spectrophotometry로 optic density를 구할때까지  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 냉동보관 하였다.

### 5. 아드리아마이신 농도에 따른 아드리아마이신 함유 골시멘트의 아드리아마이신 용출 정도

Low viscosity cement(LVC)를 이용하여 골시멘트 1g 당 아드리아마이신 2.5mg, 5mg, 25mg을 각각 섞은 후 methyl methacrylate monomer를 적당하게 혼합하여 골시멘트 pellets을 만든후, 세포배양용 dish에 각각 1개씩 넣은후 10ml의 0.9% 넣어 이를 다시 3 sets로 만들어, 1시간 간격으로 1ml의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하고, 다시 2일째부터는

매일 2주일 동안 1ml의 식염수를 채취하여 microtube에 보관하여 항암제 농도를 spectrophotometry로 optic density를 구할때까지  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동고에 냉동보관 하였다.

#### 6. 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포독성 정도

골육종 세포주인 SaOS2를 미국의 세포주 은행(ATCC)에서 분주받아, McCoy 5a 배지에서  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 조건하에서 가습 세포배양기(humidified incubator)에서 골육종 세포주 SaOS2를 배양하여, 각 dish당 세포수가  $7.5 \times 10^5$  세포가 되게 배양한 다음, 골육종 세포주 ( $7.5 \times 10^5$  세포)만 배양, 골육종 세포주( $7.5 \times 10^5$  세포)에 LVC(골시멘트만 있는 대조군)만 넣어 배양, 골육종 세포주( $7.5 \times 10^5$  세포)에 시멘트 1g당 2.5mg, 5mg, 25mg의 아드리아마이신이 각기 함유된 골시멘트 pellet을 1개씩 넣어 배양하고, 이런 모델을 3 sets씩 만들어 48시간 배양하여 세포독성 검사를 실시하였다. 이때 세포의 생존율을 확인하기 위하여 MTT dye를 5mg/ml를 첨가하여 4시간 동안 배양하여 생존한 골육종 세포 SaOS2의 mitochondrial reductase에 의해 MTT가 blue formazan crystal로 변한 것을 isopropanol로 용해시켜 550nm의 wave length를 이용하여 ELISA plate reader로 optic density를 확인하였다.

#### 7. 결과 분석 및 통계 처리

위의 각기 다른 실험군에서 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 농도는 시간 경과에 따라 분류하여 분석하였고, SPSS version 7.0의 통계 Package를 사용하여 반복 측정자료 분석법 (GLM-Repeated Measure)을 실시하였고 그 통계학적 의미를 분석하였다.

### III. 결 과

#### 1. 골시멘트 모양에 따른 아드리아마이신 용출 정도

Palacos R 골시멘트를 이용하여 만든 납작한 모양(flat shape)과 원주형(cylinder shape)의 두가지 모델을 이용하여 실험한 결과, 납작한 모양의 골시멘트 pellet에서 원주형 모양보다 항암제인 아드리아마이신 용출이 더 많았다( $p=0.003$ )(그림 1).

#### 2. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 용매에 따른 아드리아마이신 용출 정도

Palacos R 골시멘트를 이용하여 만든 원주형 모양의 pellet(2.5mg of adriamycin/ g of cement)을 ddH<sub>2</sub>O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수에 배양한 결과 각각 배양 시작 1시간부터 13시간까지 ddH<sub>2</sub>O에 비하여 0.9%, 3% 식염수의 차이를 보여주었고(각각  $p=0.028, 0.008$ ), 배양 시작 7시간이 경과된 다음에는 ddH<sub>2</sub>O에 비하여 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수와 다른 차이를 보여주었고(각각  $p=0.048, 0.022, 0.009$ ), 배양 13시간 이후에는 ddH<sub>2</sub>O에 비하여 3% 식염수만이 차이를 보여주었다( $p=0.015$ )(그림 2).

#### 3. 아드리아마이신 함유 골시멘트의 골시멘트 종류에 따른 아드리아마이신 용출 정도

배양 2시간부터 LVC와 다른 골시멘트 종류와 차이를 보이는 것으로 나타났고( $p<0.023$ ), 배양 18시간 이후 Palacos R과 CMW 3, Simplex P가 차이를 보이는 것으로 나타났다( $p<0.01$ )(그림 3).

#### 4. 아드리아마이신 농도에 따른 아드리아마이신 함유 골시멘트의 아드리아마이신 용출 정도

배양 17시간 이후 아드리아마이신 2.5mg과 25mg 사이에서 차이를 보여주었고( $p=0.04$ ), 배양 19시간 이후에는 아드리아마이신 2.5mg, 5mg, 25mg과 차이를 보여주었다(각각  $p=0.043, 0.024$ )(그림 4).

#### 5. 아드리아마이신 함유 골시멘트에서 용출된 아드리아마이신의 세포독성 정도

골육종 세포주인 SaOS2를 McCoy 5a 배지, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 가습 세포배양기(humidified incubator)내에서 48시간 동안 배양한 후, 세포의 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 SaOS2만을 배양한 경우 세포수는  $238 \times 10^4$ (사진 2), SaOS2를



LVC 골시멘트만을 넣고 배양한 경우  $62 \times 10^4$ (사진 3), SaOS2를 LVC pellet(with 2.5mg of adriamycin/ 1 g of cement)의 조건으로 배양한 경우  $12.5 \times 10^4$ (사진 4), SaOS2를 LVC pellet(with 5mg of adriamycin/ 1 g of cement)의 조건으로 배양한 경우  $5.4 \times 10^4$ (사진 5), SaOS2를 LVC pellet(with 25mg of adriamycin/ 1 g of cement)의 조건으로 배양한 경우  $1.6 \times 10^4$ (사진 6)이었다. 각각의 세포 독성은 SaOS2만 배양한 결과를 100%로 볼 때, LVC 골시멘트 74%, LVC pellet(2.5mg of adriamycin)은 95%, LVC pellet(5mg of adriamycin)은 98%, LVC pellet(25mg of adriamycin)은 99%의 세포 독성을 보여주었다(표 1).

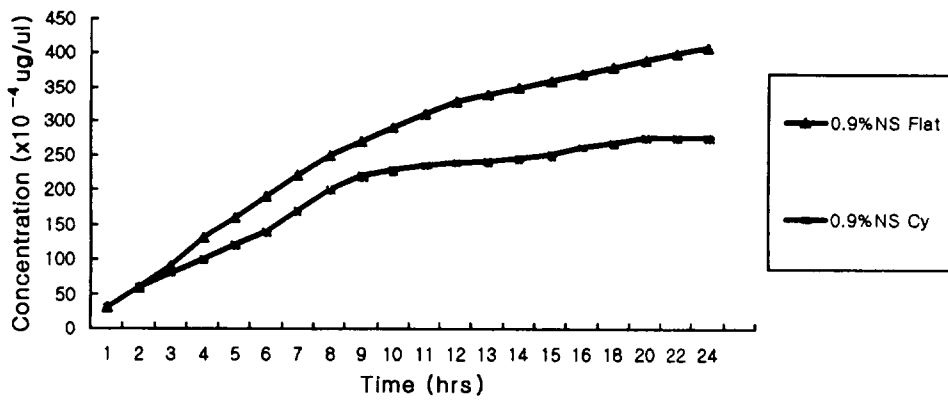


그림 1. Adriamycin differences eluted from flat or cylindrical shape(2.5mg of adriamycin-impregnated Palacos R bone cement).

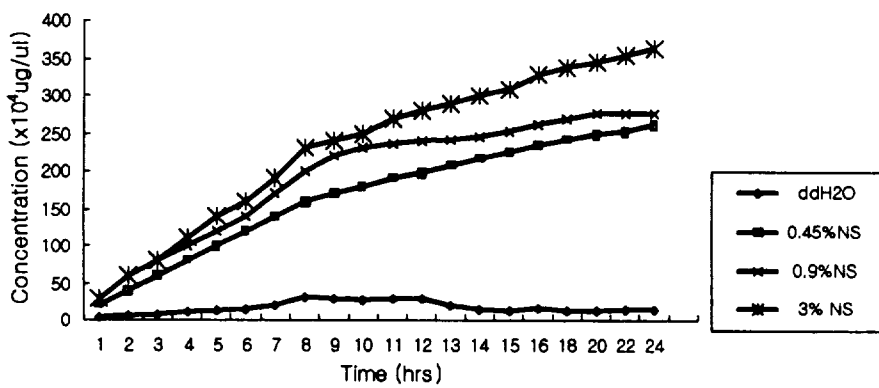


그림 2. Adriamycin differences eluted from adriamycin-impregnated Palacos R bone cement(2.5mg) under four different solutions(3%, 0.9%, 4.5% saline & ddH2O).

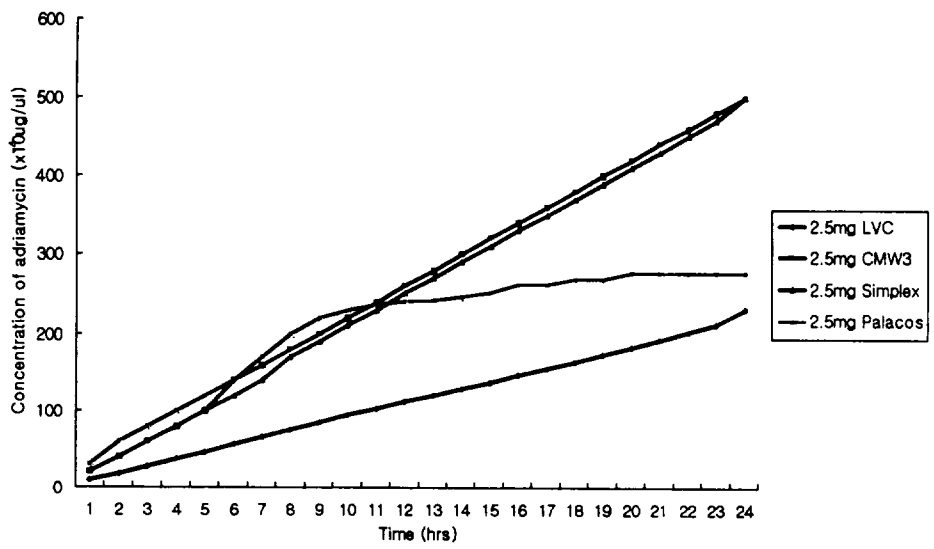


그림 3. Adriamycin concentration eluted from CMW 3 or Simplex P was higher than Palacos R or LVC.

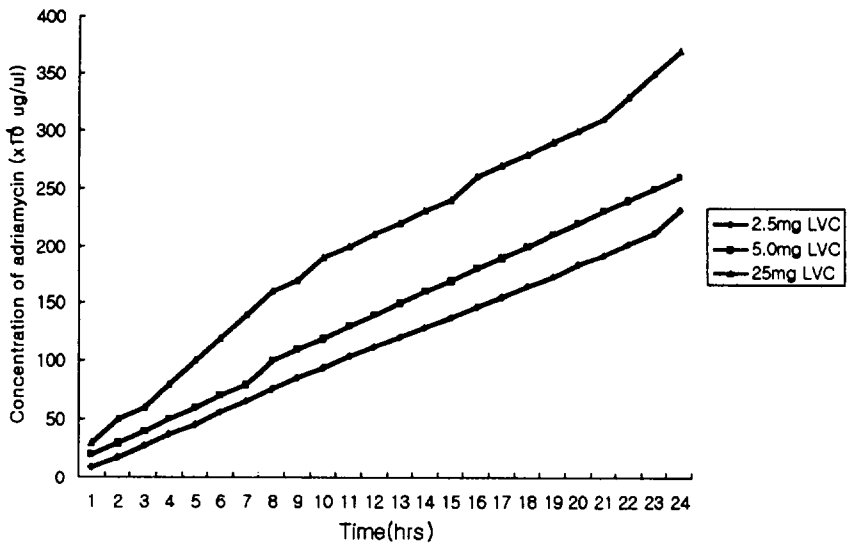
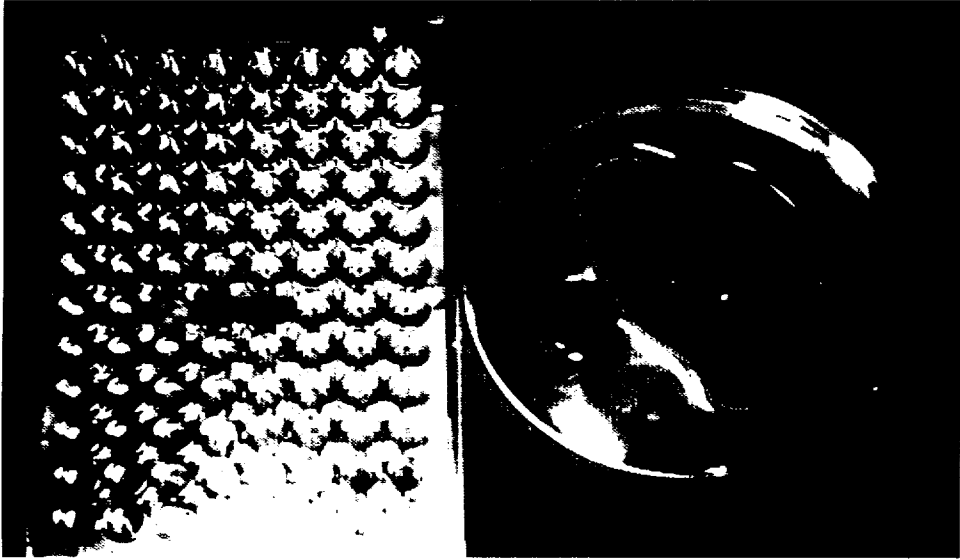


그림 4. Adriamycin concentration eluted from 25mg of adriamycin-impregnated cement(per gram of LVC cement) was higher than 5mg or 2.5mg.



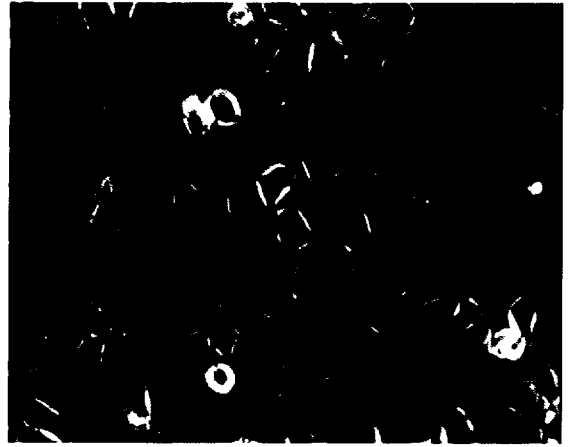
1A

1B

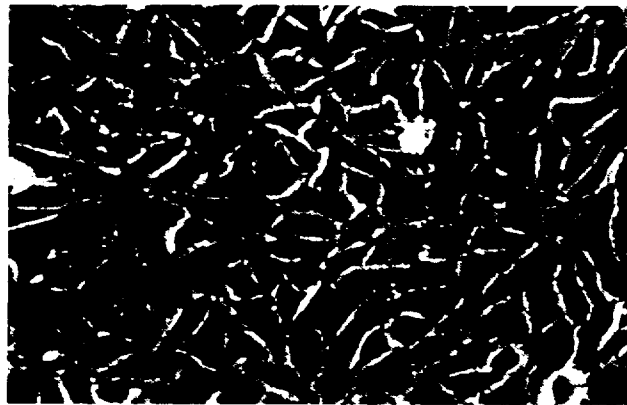
사진 1. 1A: 96 MicroWell plates(flat bottom, *Nunc*). 1B: 100mm culture dish(*Corning*) with a cylindrical Palacos R cement and 10ml of 0.9% normal saline.



2A



2B

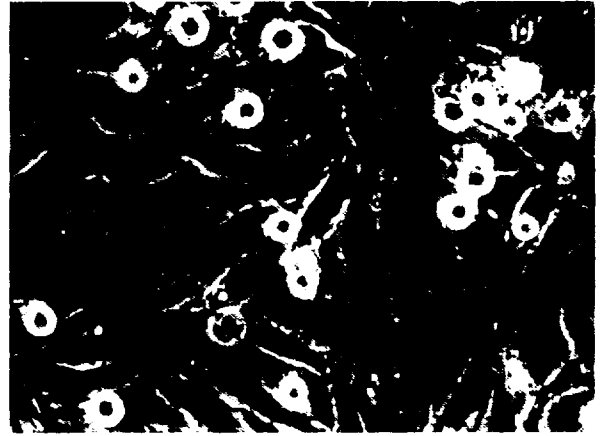


2C

사진 2. 2A: SaOS2( $7.5 \times 10^3$  cells) at initial culture. 2B: SaOS2 at 24 hours after initial culture. 2C: confluent cells of SaOS2( $238 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100).



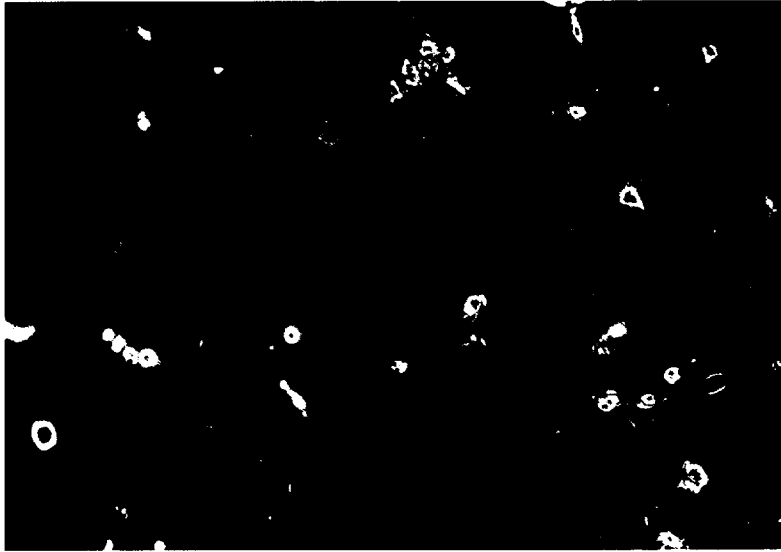
3A



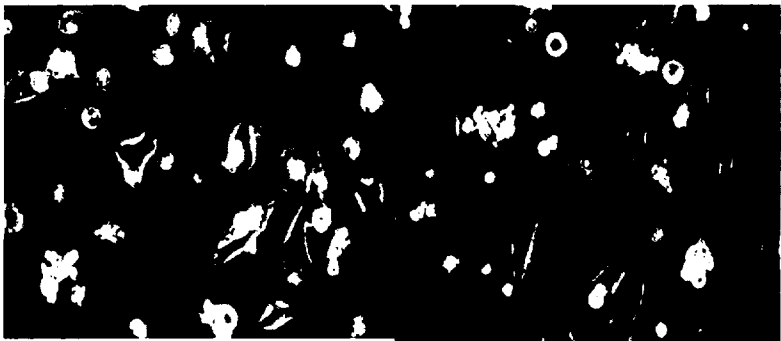
3B

사진 3. 3A: SaOS2 with LVC cement only at 24 hours after initial culture. 3B: more cellularity of SaOS2( $62 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100).



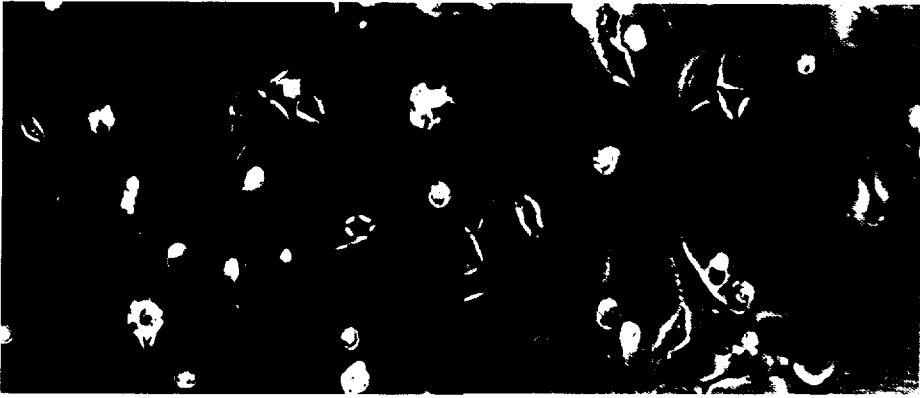


4A

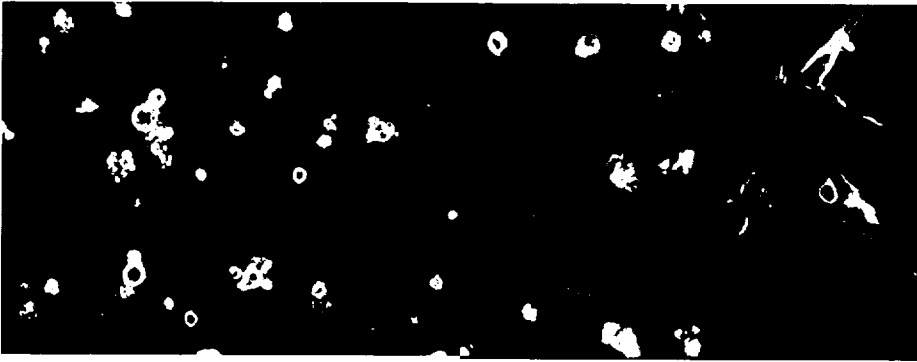


4B

사진 4. 4A: The picture shows scanty cellularity of SaOS2, cultured with 2.5mg of adriamycin-impregnated LVC cement at 24 hours after initial culture(left: center, right: periphery). 4B: The picture shows scanty cellularity of SaOS2, cultured with 2.5mg of adriamycin-impregnated LVC cement ( $12.5 \times 10^4$  cells) and cellular shrinkage and cell death at 48 hours after initial culture(x100)(left: center, right: periphery).



5A



5B

사진 5. 5A: The picture shows scanty cellularity of SaOS2, cultured with 5mg of adriamycin-impregnated LVC cement at 24 hours after initial culture(left: center, right: periphery). 5B: The picture shows almost dead cells of SaOS2, cultured with 2.5mg of adriamycin-impregnated LVC cement ( $5.4 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100)(left: center, right: periphery).



6A



6B

사진 6. 6A: The picture shows almost dead cells of SaOS2, cultured with 25mg of adriamycin impregnated LVC cement at 24 hours after initial culture(left: center, right: periphery). 6B: The picture shows all dead cells of SaOS2 with 25mg of adriamycin-impregnated LVC cement ( $1.6 \times 10^4$  cells) at 48 hours after initial culture(x100)(left: center, right: periphery).

⌘ 1. Cellular viability of SaOS2 at 48 hours after initial culture.

	Cell count	%
Without bone cement & ADR	$238 \times 10^4$	100
Bone cement	$62 \times 10^4$	26
Bone cement with 2.5mg ADR	$12.5 \times 10^4$	5
Bone cement with 5mg ADR	$5.4 \times 10^4$	2
Bone cement with 25mg ADR	$1.6 \times 10^4$	1

ADR : adriamycin

#### IV. 고 찰

최근 눈부신 분자 생물학의 발달에도 불구하고 암의 발생 기전과 전이의 기전은 아직도 정확하게 이해하지 못하고 있는 실정이다. 그러나 수많은 환자들은 상피세포 기원인 암 또는 증배염성 기원인 육종이든지간에 암에 이환되며, 그로 인하여 암에 이환된 환자는 우리나라에서 일년에 수만명씩 희생되는게 현실이다. 대부분의 암 환자들은 발생된 암의 조직학적 분류에 따라 치료 방법이 결정되게 마련이다. 그러나 대부분의 암은 수술적 적출술, 근접 방사선 치료 또는 외부 방사선 치료 같은 국소적 치료법과 항암 화학 요법, 면역 요법, 호르몬 요법 등과 같은 전신적 치료법이 단독 또는 병용 요법으로 암치료에 이용되는게 가장 효과적인 치료법으로 알려져 있다. 그러나 이중에서 수술적 적출술은 암조직을 적절한 방법 즉 광범위 절제술이나 근치적 절제술로 제거하여줌으로써 환자에서 암세포의 수가 숫적으로 적어지는 조건을 만들어준 후, 다른 국소적 치료나 전신적 치료를 실시하여 치료효과를 극대화하는 가장 효과적인 방법의 하나로 알려져 있다. 이때 미세 전이나 원격 전이된 암 세포를 궤멸시키기 위하여는 전신 항암 화학치료를 병용하는 치료법이 우수한 치료 방법으로 알려져 있다. 그러나 전신 투여를 목적으로 각종 항암 치료제를 정맥주사하는 방법은 우수한 치료 효과에도 불구하고 많은 부작용이 뒤따르는게 단점으로 알려져있으며, 이런 심각한 부작용으로 말미암아 최대한의 항암제를 사용하는데 제한이 따르기 마련이다. 대표적인 항암제 투여후 발생하는 부작용으로는 오심, 구토, 점막염, 골수 억제, 심장 독성, 탈모 등이 발생되는데, 이중에서도 특히 골수 기능저하로 암환자의 면역 기능 억제가 발생되어 이차적인 감염 등으로 사망에 이르게 하거나 혈소판 감소 등으로 뇌출혈 등의 심각한 부작용이 발생되기도 한다. 또한 부작용으로 인하여 암의 치료 효과에 미달하는 농도의 항암제를 투여하거나 항암제 투여 간격이 길어져 dose intensity가 떨어져 종종 항암 치료 효과가 반감되기도 한다.

골육종에서 각종 항암제의 단독 투여시 관해율을 살펴보면 고용량의 메토티렉세이트( $8-12g/m^2$ )는 leukovorin과 함께 투여시 50%의 관해율, 독소루비신(doxorubicin)( $90mg/m^2$ ) 투여시 30%의 관해율, 씨스플라틴(cisplatin)( $120mg/m^2$ ) 투여시 20%의 관해율, 이포스포마이드(ifosfamide)( $6-14g/m^2$ ) 투여시 25%의 관해율을 보여주어, 대개의 경우 골육종의 항암제 선택시 이들 항암제중에서 병용요법을 실시하여 좋은 치료결과를 예상할 수 있다. 이들 대부분은 항암제 용량이 증가시 골육종 치료에 대한 효과가 증가된다고 알려져 있으며, granulocyte-colony-stimulating factor(G-CSF)를 함께 투여하여 항암제 용량을 높일수 있었다는 보고가 있다. 최근에는 정맥내 항암제 투여로 인한 후유증을 극복하기 위하여 동맥

내 항암치료법이 개발되어 종양 혈관내 항암제를 최대한 투여하여, 가능하면 암조직에는 고농도의 독소루비신 또는 씨스플라틴 등의 항암제가 도달되어, 높은 항암제의 국소 농도를 유지할 수 있으며 종양의 괴사 효과가 증대되어 수술전 항암 치료의 치료성적을 향상시킬 수 있었다. 한편 국소적 항암제 투여 방법의 하나로 지혈대를 사용한 후 일정한 농도의 항암제를 국소적으로 투여하는 방법으로, 체외 순환기인 인공 심폐기를 이용한 hyperthermic perfusion 방법으로 환자에 국소적으로 고농도의 항암제 투여방법을 시도하였으나, 대퇴동맥 혈전증, 일과성 비골신경 마비, 하퇴부의 일과성 구획 증후군 등의 부작용을 남게하여 국소 항암치료 방법의 한계내지는 극복해야될 문제점들로 대두되었다.

만성 골수염에서 항생제 함유 골시멘트의 효용성에 대하여는 Buchloz 및 Engelbrecht(1970년)에 의해 처음 제안된 이래 Medcraft 및 Gardner(1974)가 Simplex P 40g에 항생제 푸시딘(Fucidin) 250mg을 섞어 만들어 항생제 함유 골시멘트를 사용한 이래 수많은 연구자들에 의해 그 효능성에 대하여 발표된바 있다. 사용된 골시멘트에도 Simplex P, CMW, Palacos R, Low Viscosity Cement 등이 이용되었고, 사용된 항생제는 골시멘트가 polymerization하는 동안 발생하는 열(3mm 두께: 60°C; 10mm 두께: 107°C)에서도 변형이 없는 안정된 항생제가 이용<sup>5,6,9,12</sup>되었는데 여기에는 겐타마이신(gentamicin), 에리스로마이신(erythromycin), 테트라사이클린(tetracycline), 메치실린(methicillin), 세팔로스포린(cephalosporin), 클린다마이신(clindamycin), 반코마이신(vancomycin) 등이 있으며, 항생제가 용출되어 효과적인 기간도 수일에서 60일까지 보고되고 있어, 항생제를 골시멘트에 섞어 사용할 경우 신체내에서 지속적으로 항생제가 용출된다는 것은 이미 알려졌으며, 그 용출되는 기전<sup>16</sup>으로 기질(matrix)을 통한 확산, 골시멘트 내의 기공을 통한 방출, 골시멘트 표면에서의 용출 등이 가설로 제시되고 있는 실정이다.

최근에 골시멘트에 항암제인 메토티렉세이트를 섞어 실험실에서 연구 결과 항암제인 메토티렉세이트가 지속적으로 용출된다는 보고<sup>2,3,4,8,10,11,13,14,15,16,17,18</sup>)가 있는 이래, 아드리아마이신<sup>15</sup>, 씨스플라틴<sup>7,15</sup>, 5-Fluorouracil<sup>4</sup>)을 골시멘트에 섞어 실험한 결과에 대하여 아주 드물게 보고하고 있다. 저자는 이 중에서 골에 발생하는 악성 종양중에서 가장 흔한 골육종의 국소 항암 요법에 대한 연구 결과가 전무하고, 아드리아마이신 함유 골시멘트에 대한 연구 또한 아주 드물어, 골육종에 대한 관해율이 사용한 항암제 용량에 비하여 비교적 높아 연구 대상으로 삼았다. 아드리아마이신은 anthracyclines의 하나로 주로 고형암의 치료제로 사용되고 있다. 아드리아마이신의 transmembrane movement는 un-ionized drug의 자유로운 확산에 의하여 이루어지거나 active efflux에 의하여 약제 이동이 이루어진다고 알려져 있으며, 독성으로는 골수 억제, 점막염, 심장 독성 등이 알려져 있다.

저자는 Palacos R, CMW 3, LVC, Simplex P 등의 4종류 골시멘트에 각기 다른 항암제 농도인 2.5mg, 5mg, 25mg(of adriamycin / g of cement), 용매를 ddH<sub>2</sub>O, 0.45% 식염수, 0.9% 식염수, 3% 식염수에 의하여 항암제 함유 골시멘트를 배양하여 용출되는 항암제의 농도를 측정하고 이때 용출된 항암제 아드리아마이신의 골육종 세포주인 SaOS2의 세포 독성에 대하여 실험한 결과 항암제의 농도가 높을수록 즉 아드리아마이신 25mg, 5mg, 2.5mg의 순으로 항암제 용출이 감소되었으며, 3% 식염수, 0.9% 식염수, 0.45% 식염수의 순으로 항암제 용출이 감소되었으며, ddH<sub>2</sub>O에서는 거의 항암제가 용출되지 않았다. 또한 시멘트의 모양이 납작한 모양(flat shape)이 원주형 보다 항암제 용출이 많았고, CMW 3, Simplex P가 Palacos R, LVC 보다 항암제 용출이 많았다. 또한 대부분의 경우 2주동안 항암제 용출에 대하여 실험을 실시하였으나, 48시간 이후에는 골시멘트에서 항암제는 거의 용출되지 않았다(data not shown). 그리고 SaOS2 배양을 실시한 결과 정상 배지에서 48시간 배양한 결과 세포 생존율을 100%라면, 골시멘트(LVC)와 함께 배양한 결과 26%, LVC pellet(2.5mg of adriamycin 함유)은 5%, LVC pellet(5mg of adriamycin 함유)은 2%, LVC pellet(25mg of adriamycin 함유)은 1%의 세포 생존율을 보여주어, 각각 74%, 95%, 98%, 99%의 세포 독성을 보여주었다.

## V. 결 론

시멘트 모양으로 납작한 모양(flat shape)이 원주형 보다 아드리아마이신 용출이 많았고, 사용된 용매중에서 ddH<sub>2</sub>O의 경우 아드리아마이신 용출이 거의 없었으며, 3% 식염수, 0.9% 식염수, 0.45% 식염수 순으로 아드리아마이신 용출이 줄어들었으며, 사용된 골시멘트 중에서 CMW 3, Simplex P가 Palacos R, LVC보다 아드리아마이신 용출이 많았고, 사용된 아드리아마이신의 농도에 따라 25mg, 5mg, 2.5mg의 순서대로 아드리아마이신의 용출이 줄어들었고, 골종양 세포주인 SaOS2를 McCoy 5a에 배양하여 아드리아마이신 함유 골시멘트와 아드리아마이신이 함유되지 않은 골시멘트를 각각 배양한 결과 세포 생존율은 SaOS2를 단독 배양한 결과를 100%라고 할 때, 골시멘트만 배양한 경우 26%, 골시멘트에 2.5mg(of adriamycin per g of cement)을 사용한의 경우 5%, 5mg(of adriamycin)을 사용한의 경우 2%, 25mg(of adriamycin)을 사용한의 경우 1%로 각각 세포 독성도는 74%, 95%, 98%, 99%로 나타났으며, 시멘트만 사용한 경우에도 세포 독성도가 74%가 되었는데 이는 골시멘트의 구성 성분중 methyl methacrylate monomer의 독성으로 사료되며, 골시멘트가 polymerization하는 동안 고열이 발생되는데, 아드리아마이신 함유 골시멘트의 실험실(*in vitro*) 실험 결과 골육종 세포주인 SaOS2 독성 실험에 유효한 것으로 나타났으며, 결국 아드리아마이신은 이 고열에 변성이 일어나지 않고 견디는 것으로 입증되었다. 향후 골시멘트에 함유된 아드리아마이신의 농도를 조절하여 정상 세포에 최소한의 독성을 나타내고 골육종 세포에 치명적인 아드리아마이신 농도를 생체실험(*in vivo*)에서 결정한다면, 임상에서 골육종 환자 종양부위의 광범위 절제술후 흔하게 사용되는 재건술 방법인 동종골 이식술이나 종양 대치물 고정 목적으로 골시멘트를 사용할 경우 사용되는 골시멘트에 아드리아마이신을 적절한 수준으로 사용하여 항암 치료 효과를 증진 시킬뿐만 아니라, 전이성 골암을 가진 환자들 중에서 말기 암환자들의 환자 상태가 절제 수술과 같은 적극적인 치료를 받기 힘들 경우 보존적 치료 방법의 하나로 아드리아마이신 함유 골시멘트를 경피적으로 환부에 시술하는 치료 방법이 보조적인 치료법의 하나로 사용될 수 있으리라 사료된다.



## 참고문헌

1. Bayston R and Milner RDG: The sustained release of antimicrobial drugs from bone cement. *J Bone Joint Surg* 64-B:460-464, 1982.
2. Chabner BA and Young RC: Threshold methotrexate concentration for *in vivo* inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues. *J Clin Invest* 52:1804-1811, 1973.
3. Degrief J, Rudigier J, Rudig L, Wahlig H and Dingeldein E: Reaction of the bone structure to methotrexate-palacos Flow y. *Arch Orthop Trauma Surg* 108:363-367, 1989.
4. Dekel S, Wasserlauf S, Salama R, Warshawsky A and Mazar Y: The release of anti-neoplastic drugs from acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg* 67-B:845-846, 1985.
5. Eyerer P and Jin E: Influence of mixing technique on some properties of PMMA bone cement. *J Biomed Mater Res* 20:1057-1094, 1986.
6. Guan WY, Yi WT, Zhi MY and Zhen SS: Experimental research on the use of an antineoplastic drug with a bone cement. *International Orthopedics* 14:387-391, 1990.
7. Greco F, Palma L, Specchia N, Jacobelli S, and Gaggini C: Polymethylmethacrylate-antiblastic drug compounds: an *in vitro* study assessing the cytotoxic effect in cancer cell lines- A new method for local chemotherapy of bone metastasis. *Orthopedics* 15:189-194, 1992.
8. Hernigou PH, Thiery JP, Benoit J, Voisin MC, Lerroux P, Hagene G, Delepine G and Goutallier D: Methotrexate diffusion from acrylic cement. *J Bone Joint Surg* 71-B:804-811, 1989.
9. Hill J, Klenerman L, Trustey S and Blowers R: Diffusion of antibiotics from acylic bone-cement *in vitro*. *J Bone Joint Surg* 59-B:197-199, 1977.
10. Isacoff WH, Morrison PF, Aroesty J, Willis KL, Block JB and Lincoln TL: Pharmacokinetics of high-dose methotrexate with citrovorum factor rescue. *Cancer*

Treat Rep 61:1665-1674, 1977.

11. Kirchen ME, Medendez LR, Lee JH, and Marshall GJ: Methotrexate eluted from bone cement. Clin Orthop 328:294-303, 1996.
12. Meyer PR Jr, Lautenschlager EP, Moore BK: On the setting properties of acrylic bone cement. J Bone Joint Surg 55A:149-156, 1973.
13. Park JM, Moon CH and Lee MG: Pharmacokinetic changes of methotrexate after intravenous administration to streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. Res Commu Mol Pathol Pharmacol 93(3):343-352, 1996.
14. Park JM, Moon CH and Lee MG: Pharmacokinetic changes of methotrexate after intravenous administration to uranyl nitrate-induced acute renal failure rats. Res Commu Mol Pathol Pharmacol 93(3):353-362, 1996.
15. Wasserlauf S, Warshawsky A, Arad-Yelin R, Mazur Y, Salama R and Dekel S: The release of cytotoxic drugs from acrylic bone cement. Bulletin Hospital for Joint Diseases 53(1):68-74, 1993.
16. Wang HM, Galasko CSB, Crank S, Oliver G and Ward CA: Methotrexate loaded acrylic cement in the management of skeletal metastasis. Clin Orthop 312:173-186, 1995.
17. Ekstrom PO, Andersen A, Warren DJ, Giercksky KE and Slordal L: Pharmacokinetics of different doses of methotrexate at steady state by in situ microdialysis in a rat model. Cancer Chemother Pharmacol 36:283-289, 1995.
18. Brimmell PA and Sams DJ: Rapid and simple assay for the measurement of methotrexate in serum, urine and red blood cells by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatography 413:320-325, 1987.

- Abstract -

**Cellular toxicity of adriamycin eluted from adriamycin-impregnated bone cement**  
*(Possibility of local chemotherapy for cancer)*

Dong Wook Jang

Department of Medical Science  
The Graduate School, Ajou University

*(directed by Associate Professor Byoung-Suck Kim)*

Recent treatment protocols for osteosarcoma included a combination therapy of preoperative chemotherapy, surgical resection, and postoperative chemotherapy. Chemotherapy was administrated by a systemic route, however, the limitation of its dosage was noticed due to systemic complications, including myelosuppression, cardiotoxicity, mucositis, nausea, vomiting, and so on. The bony defect after surgical resection of the tumor was usually managed by allograft or tumor prosthesis, which were usually fixed to the host bone by bone cement.

Reports were included a lots of successful results that insistent chronic osteomyelitis succumbed to antibiotics-impregnated bone cement, which continuously released the antibiotics into the surround tissue. Author have made an anticancer drug-impregnated bone cement model for studying its drug release into the surround tissue. This study included changes between the shapes of adriamycin-impregnated bone cement and changes according to various solutions, various cement types, various concentrations of adriamycin and cellular toxicity for adriamycin eluted from adriamycin-impregnated bone cement.

Author noticed that flat shape of adriamycin-impregnated bone cement eluted

adriamycin more than cylindrical shape, adriamycin-impregnated bone cement cultured with 3% saline more eluted with 0.9% or 0.45% saline, however, there was trivial elution of adriamycin with ddH<sub>2</sub>O. Adriamycin eluted from CMW 3 and Simplex P were more than Palacos R and LVC. Cellular toxicity of 25mg of adriamycin, 5mg, 2.5mg per g of cement was 99%, 98%, 95%, 74%, respectively.

Author thought that adriamycin-impregnated bone cement might be one of excellent drug delivery systems for cancers.