

고압의 아산화질소와 Methotrexate에 의한 암세포 성장 억제 효과

서울대학교 의과대학 마취과학교실, *압구정 서울성형외과

안원식 · 김지연* · 박재현 · 박종두 · 김성덕

Growth Suppression of Leukemic Cells by Hyperbaric Nitrous Oxide and Methotrexate

Won Sik Ahn, M.D., Ji Yeon Kim, M.D.*, Jae Hyon Bahk, M.D., Chong Doo Park, M.D., and Seong Deok Kim, M.D.
Department of Anesthesiology, Seoul National University College of Medicine, Seoul; *Seoul Plastic Surgery Clinic, Seoul, Korea

Background: Nitrous oxide inactivates cobalamin which is important in the folate-dependent synthesis of thymidylate. Also, methotrexate has the anti-cancer activity. The aim of this work was to determine the optimal pressure and exposure time of nitrous oxide that maximize the suppression of cancer growth, and the adequate level of methotrexate that maximize the anti-cancer activity of nitrous oxide.

Methods: Acute lymphoblastic leukemic cells and normal lymphocytes were cultured in hyperbaric chamber at 1, 2 and 3 atm of 74% nitrous oxide in 24, 48 and 72 hours at 0, 0.3, 0.5 and 0.7 μ M of methotrexate, respectively. The results were expressed in the ratio of cell number in hyperbaric chamber to that in the incubator.

Results: Compared to control, the growth rates of cancer cells and lymphocytes were 0.767, 0.990 at 1 atm, 0.592, 0.880 at 2 atm and 0.718, 0.864 at 3 atm of nitrous oxide in 24 hours. The survival fraction of cancer cells and lymphocytes were 0.767, 0.894 in 24 hours, 0.800, 0.630 in 48 hours, and 0.571, 0.597 in 72 hours, at 1 atm of nitrous oxide. The growth rates of cancer cells and lymphocytes were 1.012, 0.745 at 0 μ M, 0.912, 0.696 at 0.3 μ M, 0.77, 0.647 at 0.5 μ M and 1.133, 0.506 at 0.7 μ M of methotrexate.

Conclusions: The pressure increase of nitrous oxide significantly suppressed the growth of lymphocyte but not cancer cells. However, growth of cancer cells and lymphocytes were significantly reduced at high concentration of methotrexate and larger exposure time. (Korean J Anesthesiol 2006; 50: 308~14)

Key Words: cobalamin, leukemia, methotrexate, nitrous oxide.

서 론

아산화질소(nitrous oxide)는 전신 마취 시 사용되는 흡입 마취제로써 마취의 유도도와 각성이 빨리 이루어지며 그 자체로도 진통 효과가 있으며, 체내 특정 장기에 흡수나 대사가 되지 않기 때문에 장기 독성이 적으며 가격도 저렴하여 마취과에서 가장 많이 사용되는 약제이다. 하지만 아산화질소만으로 마취 효과를 나타내기 위해서는 1기압 이상의 압력으로 아산화질소를 공급하여야 하기 때문에 임상에서 사

용할 때에는 50-70% 아산화질소를 다른 흡입 마취제와 병용하여 마취를 유지하게 된다. 1970년대에 6시간 이상 아산화질소와 흡입마취제를 사용한 전신 마취한 환자에서 경도의 조혈 억제 작용이 있는 것을 발견하였고 24시간 이상 마취한 환자에서는 거대적아구성 범혈구감소증이나 척수 신경의 수초탈락으로 인한 신경계 장애가 일어난다는 것을 알게 되었다.¹⁾ 이에 대한 원인을 규명하기 위한 연구가 진행되었으며 현재까지 알려진 바로는 아산화질소가 DNA 구성요소 중의 하나인 thymidylate (dTMP)의 합성을 방해하여 세포 성장 억제 효과가 나타난다는 것이다.²⁾ 즉, 세포 내에서 DNA를 합성하기 위해서는 구성 요소 중 하나인 thymidylate를 생성하기 위해서는 엽산의 대사가 필수적이다. 음식물로 공급되는 folate monoglutate는 5-methyl-tetrahydrofolate (THF)을 거쳐 THF, 10-formyl-THF, 5, 10 methylene-THF, 다시 5-methyl-THF로 순환을 하게 된다. 엽산 대사 중 thymidylate는 5, 10-methylene-THF와 deoxyuridylate (dUMP)가 결합

논문접수일 : 2005년 11월 30일

책임저자 : 김지연, 서울시 강남구 신사동 582-9 클리닉나인 4층

압구정 서울성형외과, 우편번호: 135-892

Tel: 02-547-5100, Fax: 02-547-7859

E-mail: kji1448@korea.com

이 논문은 서울대병원 일반연구과제(04-2004-062-0)임.

하여 THF와 thymidylate로 전환되어 thymidylate는 DNA 합성에, THF는 5-methyl-THF를 거쳐 다시 5, 10-methylene-THF로 돌아와 다시 순환을 하게 된다. 5-methyl-THF는 homocysteine과 만나 methyl 기를 주고받으며 THF와 methionine으로 전환되어 순환의 한 부분을 담당하는데 methyl 기를 전달하는데 필요한 효소가 methionine synthase (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase)이다. Methionine synthase는 조효소로 cobalamin을 이용하는데, 아산화질소는 이 cobalamin을 산화시켜 불활성화하여 methionine synthase가 작용을 하지 못하게 함으로써 THF의 생성을 억제, 엽산의 대사를 방해하여 5, 10-methylene-THF와 THF 사이에서 생성되는 thymidylate을 생성을 억제하여 DNA의 합성에 지장을 초래하여 세포의 성장을 억제한다. 아산화질소의 세포 성장 억제 효과는 세포의 성장이 활발한 조혈세포에서 가장 잘 나타나며 비타민 B₁₂를 투여하면 일부 가역이 되는 것으로 알려져 있다.³⁻⁵⁾

현재 아산화질소의 세포 성장 억제 작용을 이용하여 종양의 치료에 이용하려는 연구가 진행되고 있다.⁶⁻¹⁰⁾ 종양의 치료 방법으로는 종양 조직을 절제하는 수술적 요법, 약제를 이용한 전신 항암 요법, 방사선을 이용한 방사선 치료 등의 3가지가 대표적인 방법으로 이용되고 있다.¹¹⁾ 이 중 수술이나 방사선 치료는 국소적인 종양에는 효과적이거나 여러 장기에 퍼져 있는 경우에는 적용하기 어려운 단점이 있다. 약제를 이용한 전신 항암 요법은 전신에 퍼져 있는 암 조직의 파괴가 목적이거나, 정상 조직의 독성 또한 심하여 감염이나 출혈 등의 부작용으로 유발하고 이로 인해 사망에 이르는 경우가 많다. 그리하여 이러한 부작용을 최소한으로 줄이고 항암 효과를 극대화시킬 수 있는 신약 개발을 위한 연구가 세계 곳곳에서 부단히 이루어지고 있다.¹²⁾ 그러나 신약의 경우 그 가격이 고가이어서 환자에게는 큰 부담이 된다. 따라서 이러한 기존 항암 요법의 부작용과 비용 부담을 최소화할 수 있는 새로운 치료법의 개발이 절실한 실정이다. 아산화질소는 세포 성장 억제 작용을 가지고 있으면서 가격이 매우 저렴하기 때문에 항암 치료의 새 치료법으로 이용하려는 연구가 진행 중이다. 현재 세포 단계의 연구에서는 정상 대기압의 아산화질소는 백혈병 세포의 증식을 50% 가량 억제하는 효과가 있으며, dihydrofolate reductase inhibitor인 methotrexate, 5-fluorouracil 등과 병용 시 더 큰 효과를 낸다는 것이 보고되었다.¹³⁻¹⁷⁾ 그러나, 아산화질소의 항백혈병 작용에 대한 과거의 연구들은 대부분이 정상 대기압(760 mmHg, 1 atm)에서 아산화질소의 분율만 50% (360 mmHg) 혹은 80% (608 mmHg)로 높여 장시간(18시간 혹은 24시간) 투여 후의 효과를 관찰한 것이어서 아산화질소의 1 MAC (798 mmHg)에도 미치지 못하는 정도의 양을 투여하여 실험한 것이었다.¹²⁾ 즉, 1기압 하에서는 적절

한 산소공급을 위하여 총 공급 가스 중에 25-30%를 190-228 mmHg의 산소를 공급하고 나머지 분율 중에 아산화질소 부분을 최대화하여 실험하였다. 그러나, 아산화질소를 2기압이나 3기압으로 높이면, 세포 생존에 필요한 산소의 분율(21%)을 공급하면서 아산화질소의 공급량을 2기압 적용 시에는 약 1,120 mmHg, 3기압 적용 시에는 약 1,700 mmHg로 늘릴 수 있다. 하지만, 현재 고압으로 아산화질소를 공급하여 투여량을 증가시켰을 때의 암세포의 성장 속도에 어떤 영향을 주는지에 대해서는 연구된 바가 없다. 다만, 마취과 영역에서는 고압의 아산화질소가 마취의 심도를 어떻게 변화하는지, 고압의 아산화질소가 투여되었을 때 신체 각 장기에 주는 영향에 대해서는 연구가 되어 있다.^{18,19)} 고압의 50-60% 아산화질소와 산소를 같이 마취를 하면 압력이 증가할수록 마취의 심도가 높아져서 단독으로 마취 효과를 나타내며, 간질을 억제하는 효과를 보인다. 하지만 아산화질소의 압력이 증가함에 따라 교감신경계의 활동이 증가하게 되어 심박수와 혈압이 증가하고 호흡횟수가 증가하며 오심과 구토가 증가하게 되며 4기압 이상(3,040 mmHg)의 아산화질소를 단기간만 투여하여도 환자의 의식이 혼미해지고 각 장기의 기능이 전반적으로 저하되기 때문에 그 이상의 압력을 올리는 것은 위험한 것으로 되어 있다.

이 연구에서는 고압의 아산화질소를 투여하였을 때와 정상 압력으로 아산화질소를 투여하였을 때 암세포의 성장에 어떤 영향을 주는지를 관찰하고, 또한 각각의 압력 하에서 methotrexate을 같이 사용하였을 때의 암세포 성장 속도에 어떤 변화를 주는지를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

연구재료

암세포는 급성 림프구성 백혈병을 가진 4세 백인 여아의 림포아구인 CCRF-CEM을 사용하였다. CCRF-CEM는 RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Scotland) 42.5%, fetal bovine serum (FBS) 40%, DMSO 7.5%로 구성된 배지에서 냉동 보관하고 실험에 사용할 때는 이산화탄소 배양기에서 RPMI 1640 80%, FBS 20% 배지를 이용하여 배양하였다. 빛에 민감하게 반응하며 원심분리로 적혈구와 단핵세포를 분리할 때 사용하는 Ficoll (lymphoprep 1077, GIBCO-BRL, Scotland)은 20°C에서 보관하였다. 세포성장 촉진제로 사용된 Karyo MAX phytohemagglutinin M form lyophilized (PHA, GIBCO-BRL, Scotland)는 2-8°C에서 보관하였으며 배양액 100 ml당 1-2 ml을 혼합하였다.

연구방법

정상 T 림프구 배양: 수술실에서 수술을 받는 환자 중 혈

액 종양이 없는 환자에게서 실험 전 동의를 얻은 후 말초 혈액 5 ml를 무균적으로 heparin화된 관에 채취하였다. 한 사람에게서 얻은 혈액은 모두 같은 압력, 노출시간, methotrexate 농도에서 실험하였다. Ficoll을 담은 15 ml의 원뿔형 관에 PBS와 혈액을 1 : 1로 혼합한 액을 Pasteur pipette로 위에서 천천히 넣었다. 혼합액을 20-25°C에서 1,750 rpm으로 20분간 원심분리 후 혈청, 적혈구, 단핵세포 층으로 나뉘면 그 중 단핵세포 층만 분리하여 다시 PBS를 넣고 20°C, 1,450 rpm으로 10분간 2번 원심 분리한 후 세포 수를 측정하였다. RPMI 1640 배지에 단핵세포들을 넣고 PHA 100µl를 첨가하여 T 림프구를 키우고 항온(37°C) 이산화탄소 배양기에 하루 동안 배양한 후 단위 ml당 T 림프구 수를 측정하였다. 이것을 두 군으로 나누어 항온 이산화탄소 배양기와 고압 아산화질소 탱크에 넣고 난수표에 의해 정해진 시간 동안 배지를 키운 후 꺼내어 세포 수를 측정하였다.

백혈병 세포 CCRF-CEM 배양: 냉동 상태의 백혈병 세포 CCRF-CEM을 녹인 후 항생제가 있는 RPMI 1640 배지에 넣고 37°C의 이산화탄소 배양기에 하루 동안 배양한 후 단위 ml 당 세포 수를 측정하였다. 이것을 두 군으로 나누어 항온 이산화탄소 배양기와 고압 아산화질소 탱크에 넣고, 난수표에 의해 정해진 시간 동안 배지를 키운 후 꺼내어 세포 수를 측정하였다.

Methotrexate가 첨가된 배지에서의 정상 T 림프구와 백혈병 세포 CCRF-CEM의 배양: 배지에 methotrexate 0, 0.3, 0.5, 0.7µM을 첨가한 후 위와 같은 방법으로 항온(37°C) 이산화탄소 배양기와 고압 아산화질소 탱크에 정상 T 림프구와 CCRF-CEM을 같이 넣고, 난수표에 의해 정해진 시간 동안 키운 후 꺼내어 세포 수를 측정하였다.

압력과 시간의 배정: 정상 T 림프구와 백혈병 세포 CCRF-CEM을 넣은 압력과 시간은 난수표에 의해 배정을 하고 각 압력과 시간 조합 당 10회의 반복(검정력 80% 유지, P = 0.05)을 수행하였다. 각 압력 당 가스의 분포는 Table 1과 같고, 시간은 24시간, 48시간, 72시간 노출하였다.

Table 1. The Composition and Partial Pressure of Gases Used in This Study

	O ₂ (mmHg)	CO ₂ (mmHg)	N ₂ (mmHg)	N ₂ O (mmHg)
1 atm	160	38	562	-
2 atm	320	76	1,124	-
3 atm	480	114	1,686	-
1 atm	160	38	-	562
2 atm	-	76	-	1,124
2 atm	160	76	-	1,284
3 atm	480	114	-	1,686

자료처리 및 분석: 모든 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내고 각 군에 대한 분석은 one-way analysis of variance (ANOVA)로 실시하고 P값이 0.05 이하인 경우를 의미있는 것으로 간주하였다.

Table 2. The Growth Rate of Cancer Cells

Methotrexate dose (µM)	Duration of N ₂ O exposure (hr)	Growth rate at		
		1 atm	2 atm	3 atm
0	24	0.767 ± 0.141	0.592 ± 0.043	0.718 ± 0.099
	48	0.800 ± 0.111	0.678 ± 0.068	0.806 ± 0.155
	72	0.571 ± 0.404	0.349 ± 0.211	0.381 ± 0.051
0.3	24	0.875 ± 0.265	0.744 ± 0.153	0.846 ± 0.253
	48	0.877 ± 0.233	0.692 ± 0.218	0.655 ± 0.112
	72	0.843 ± 0.088	0.857 ± 0.109	0.750 ± 0.051
0.5	24	0.776 ± 0.146	1.043 ± 0.274	0.739 ± 0.112
	48	1.054 ± 0.191	0.628 ± 0.157	0.547 ± 0.112
	72	0.847 ± 0.255	0.715 ± 0.363	0.584 ± 0.157
0.7	24	0.588 ± 0.118	1.049 ± 0.170	0.750 ± 0.121
	48	0.622 ± 0.048	0.833 ± 0.338	0.513 ± 0.163
	72	0.514 ± 0.154	0.625 ± 0.177	0.600 ± 0.125

n: 10 in each group. Data are mean ± SD. The growth rate of cancer cells is the ratio of the cell number at designated time/cell count at initial time in tank to cell count at designated time/cell count at initial time in incubator.

Table 3. The Growth Rate of Lymphocytes

Methotrexate dose (µM)	Duration of N ₂ O exposure (hr)	Growth rate at		
		1 atm	2 atm	3 atm
0	24	0.990 ± 0.187	0.880 ± 0.072	0.718 ± 0.076
	48	0.748 ± 0.074	0.806 ± 0.081	0.446 ± 0.066
	72	0.711 ± 0.058	0.681 ± 0.116	0.329 ± 0.063
0.3	24	0.446 ± 0.032	0.756 ± 0.133	0.655 ± 0.055
	48	0.455 ± 0.088	0.743 ± 0.106	0.522 ± 0.255
	72	0.311 ± 0.052	0.841 ± 0.155	0.468 ± 0.348
0.5	24	0.596 ± 0.062	0.955 ± 0.611	0.988 ± 0.215
	48	0.755 ± 0.155	0.686 ± 0.151	0.669 ± 0.221
	72	0.701 ± 0.066	0.806 ± 0.214	0.060 ± 0.021
0.7	24	0.851 ± 0.154	0.866 ± 0.123	0.658 ± 0.056
	48	0.754 ± 0.251	0.497 ± 0.120	0.540 ± 0.064
	72	0.643 ± 0.089	0.531 ± 0.158	0.145 ± 0.049

n: 10 in each group. Data are mean ± SD. The growth rate of cancer cells is the ratio of the cell number at designated time/cell count at initial time in tank to cell count at designated time/cell count at initial time in incubator.

결 과

암세포의 성장률은 1, 2, 3기압으로 아산화질소의 압력이 증가함에 따라 각각 0.729, 0.799, 0.614였으나 통계적으로 차이가 없었으나 림프구, 정상세포에서는 아산화질소의 압력이 1, 2, 3기압으로 증가함에 따라 생존율이 0.796, 0.679, 0.522로 의미있게 감소하였다. 노출 시간에 따른 세포 성장률의 변화를 보면 암세포는 24시간과 48시간은 0.785과 0.678로 통계적으로 의미있게 감소하였으나 48시간과 72시간의 성장률은 유의한 차이가 없었다. 림프구의 성장률도 시간이 24, 48, 72시간으로 증가함에 따라 0.894, 0.630, 0.597로 감소하였으며 암세포와 같이 24시간과 48시간의 성장률은 통계적으로 의미있게 감소하였고 48시간과 72시간의 성장률

은 유의한 차이가 없었다. Methotrexate의 농도 변화에 따른 성장률의 변화는 각 압력과 시간에 따라 다른 결과를 보였다. 24시간 동안 아산화질소에 노출된 암세포는 압력에 따라 성장률의 변화는 없으나 methotrexate의 농도가 증가함에 따라 성장률이 감소하였다. 48시간 노출된 경우는 압력이 증가함에 따라, methotrexate 농도가 증가함에 따라 감소하였으며 그 중 0.3 μ M과 0.5 μ M의 성장률은 유의한 차이를 보였다. 노출 기간이 72시간인 경우 압력에 따라, methotrexate 농도 변화에 따라 성장률에 유의한 차이가 없었다(Table 2, 3, Fig 1).

압력에 의한 성장 억제를 보기 위하여 압력과 노출 시간을 아산화질소와 동일하게 하여 21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂를 투여하였을 때 암세포의 성장 억제 정도는 두 군에서 통계적으로 의미있는 차이가 없었다(Table 4).

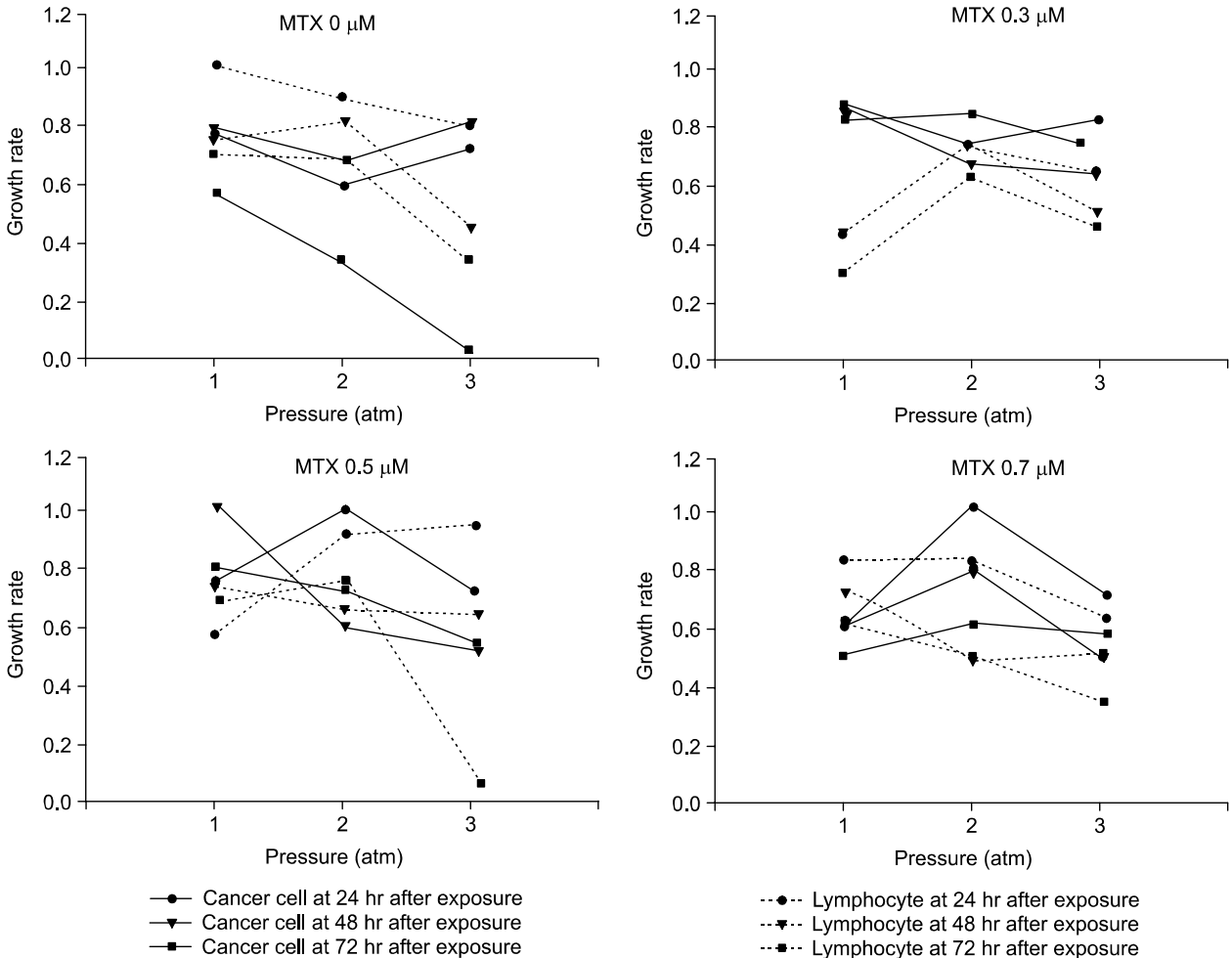


Fig. 1. The growth rate of lymphocytes at 1, 2, 3 atm and 24, 48, 72 hours of nitrous oxide with 0 μ M (A), 0.3 μ M (B), 0.5 μ M (C) and 0.7 μ M (D) methotrexate. Data are mean of growth rate. Nitrous oxide suppressed the growth of both cancer cells and lymphocytes. The increase in its pressure significantly suppressed the growth of lymphocyte but this did not have any significant effect on cancer cells. Growth of both cancer cells and lymphocytes were significantly reduced at high concentration of methotrexate and time.

Table 4. The Growth Rate of Cancer Cells After Exposure to N₂O or N₂ without Methotrexate

Gas	Duration of exposure (hr)	Growth rate at		
		1 atm	2 atm	3 atm
N ₂ O	24	0.767 ± 0.141	0.592 ± 0.043	0.718 ± 0.099
	48	0.800 ± 0.111	0.678 ± 0.068	0.806 ± 0.155
	72	0.571 ± 0.404	0.349 ± 0.211	0.038 ± 0.051
N ₂	24	0.579 ± 0.236	0.886 ± 0.253	0.660 ± 0.215
	48	0.858 ± 0.274	0.356 ± 0.092	0.394 ± 0.036
	72	0.562 ± 0.202	0.347 ± 0.093	0.089 ± 0.021

n: 10 in each group. Data are mean ± SD. The growth rate of cancer cells is the ratio of the cell number at designated time/cell count at initial time in tank to cell count at designated time/cell count at initial time in incubator.

Table 5. The Growth Rate of Cancer Cells after Exposure to O₂ at 2 atm Pressure of N₂O without Methotrexate

O ₂ (%)	Duration of Exposure (hr)		
	24	48	72
21	0.592 ± 0.043	0.678 ± 0.068	0.349 ± 0.211
10.5	0.694 ± 0.141	0.654 ± 0.158	0.562 ± 0.301

n: 10 in each group. Data are mean ± SD. The growth rate of cancer cells is the ratio of the cell number at designated time/cell count at initial time in tank to cell count at designated time/cell count at initial time in incubator.

동일한 2기압 하에서 가스의 성분 변화에 따른 암세포의 성장률을 보면 10.5% 산소로 배양을 한 경우에는 노출 시간에 따라 세포 성장률의 변화가 없었으며, 21% 산소로 24, 48시간 노출한 경우에는 10.5% 산소에 노출한 군과 유사한 성장률을 보였으나, 72시간 노출하였을 때에는 다른 군에 비하여 세포의 성장이 억제되는 경향을 보였다(Table 5).

고 찰

현재 사용되는 항암 화학요법은 folate의 대사를 억제하여 DNA의 형성을 방해하여 세포의 성장을 억제하는 방법이다.¹¹⁾ 그 중 대표적인 약제인 methotrexate, 5-fluorouracil 등은 dihydrofolate reductase의 활성을 비활성화하여 thymidylate의 합성을 억제하여 효과를 나타낸다. 체내에서 folate의 대사에 methyl기를 제공하는 것이 methionine이며 암세포에서는 정상세포보다 분열 속도가 빠르기 때문에 methionine에 의존적인 성향을 갖게 된다. 하지만 항암제의 사용은 정상 세

포의 성장도 억제하기 때문에 이에 따른 부작용을 유발한다. 이런 이유로 항암제의 용량을 줄여서 정상 세포에 대한 영향을 적게 하면서 항암효과를 강화하기 위한 방법이 여러 가지로 연구되고 있다. Methionine의 전구체로 사용될 수 있는 아미노산의 식이를 제한하는 방법이나 아산화질소를 투여하여 성장 억제 현상을 이용하는 방법 등이 그런 연구 중의 하나이다.^{6,8)} 그 중 아산화질소의 세포 성장 억제 효과는 장기간의 전신마취 후에 골수억제나 신경계 이상이 나타난다는 것이 알려지면서 활발히 연구되기 시작하였으며 이와 함께 아산화질소를 항암 치료에 이용하려는 연구도 진행되고 있다.^{7,9)} 지금까지의 아산화질소에 대한 연구에서는 1기압의 아산화질소를 50-80%로 18시간 이상 투여하였을 때 50%의 세포 성장 억제가 있으며 비타민 B₁₂나 folate 대사 관련 물질을 투여할 경우 부분적으로 가역 되는 것으로 알려져 있다. 하지만 고압으로 아산화질소를 투여하였을 때의 영향에 대해서는 아직 알려진 바가 없으며 다만 고압의 아산화질소를 투여하게 되면 신체에 어떤 영향을 주는지에 대해서만 연구되고 있다.^{18,19)} 이 연구에서는 아산화질소를 1, 2, 3기압으로 투여했을 때의 세포 성장 속도가 1기압으로 투여했을 때와 어떻게 다른지를 알아보는 것이다. 결과에서와 같이 아산화질소의 압력이 증가할수록, 노출 기간이 길어질수록 두 군 모두 성장이 억제되었다. 하지만 암세포의 성장속도는 아산화질소를 1기압과 2기압으로 투여하였을 때는 성장 억제 정도가 상이하지 않았으며 3기압에서는 성장의 감소가 심화됐지만 각 기압간에 통계적으로는 의미 있게 변화를 보이지는 않았다. 림프구는 압력이 증가함에 따라 세포의 성장이 감소하였으며 또한 통계적으로 유의하였다. 즉, 아산화질소의 투여 압력 증가에 따라 정상 세포 성장의 억제는 증가하지만 암세포의 경우에는 의미 있는 차이를 보이지 않는다. 그러므로 아산화질소의 압력을 증가시키면 기대하는 항암 효과보다는 정상세포 억제로 인한 부작용을 더 유발할 수 있다. 암세포와 정상세포에 대한 영향을 모두 고려하였을 때 1기압의 아산화질소를 투여하는 것이 가장 이상적일 것이라 생각된다.

아산화질소 2기압에서의 결과와 1기압의 결과를 비교해 볼 때 암세포의 경우는 의미 있는 차이가 없었다. 이것에 대해 한가지 고려해야 할 것은 기압의 증가로 인한 산소의 증가이다.^{6-8,19)} 체내 조직에서의 산소 농도와 노출 시간에 따라 혈관과 콜라겐의 합성, 세포의 성장이 촉진되기 때문에 임상에서는 조직 이식 후 고압의 산소에 노출하여 상처의 재생을 촉진시키는 이용한다. 하지만 어느 압력 이상, 어느 기간 이상이 되면 O₂ radical 등에 의한 산소 독성이 나타나게 되어 세포의 성장은 도리어 억제되는 효과가 나타나게 된다. 산소의 압력과 노출 시간과의 관계는 아직 정립된 것이 없으며, 같은 압력에서도 초기에는 세포의 성장

이 촉진될 수 있지만, 시간이 지남에 따라 O_2 radical 등과 같은 reactive oxygen species이 형성이 되어 세포의 성장을 억제할 수도 있다. 이번 연구에서 암세포의 성장 속도가 1, 2기압보다 3기압에서의 더 많이 억제되는 것과, 같은 2기압이라도 산소의 농도에 따라 세포 성장률이 다른 이유로 이런 점을 배제할 수 없다. 현재 고압 산소 요법의 세포 성장 억제 효과를 이용하여 항암치료나 방사선치료를 병용하려는 연구가 진행되고 있다. 21% O_2 , 5% CO_2 , 74% N_2 의 조성으로 압력을 증가하면 아산화질소와 동일한 성장 억제효과를 보인다. 산소와 질소의 압력이 증가하면서 질소에 의한 나트륨 통로의 변성으로 세포막의 투과성이 변화하면서 세포의 성장이 억제되고 산소의 증가에 의한 산소 독성에 의하여 세포의 성장 또한 억제된다. 그리고 고압의 탱크를 감압 없이 개방하는 것도 세포의 수를 감소시키는 이유가 될 수 있을 것이다.

아산화질소의 투여기간에 대해서는 암세포와 정상세포 모두에서 시간이 지날수록 억제가 더 일어나는 것을 알 수 있다. 그 중에서 암세포의 경우는 24시간 때보다 48시간일 때가 더 억제되었으며 72시간 때는 더 억제되었으나 앞의 결과들보다는 억제되는 정도가 비례해서 감소하지는 아니하였다. 그에 비해 정상세포는 시간이 증가할수록 감소하므로 가장 이상적인 노출기간은 48시간으로 생각할 수 있다. Methionine에 의존적인 세포를 대상으로 한 연구에서는 아산화질소에 3일간 노출한 후 methionine synthase의 활성을 알기 위하여 homocysteine 추출물, deoxyuridine suppression 검사, 혈중 내 비타민 B_{12} , folate 대사물 등을 검사하였을 때 아산화질소의 억제가 가장 많이 되는 시점은 2일째가 가장 많으며 3일에는 어떤 기전인지는 알 수 없지만 그 일부의 생성이 회복이 되었다.^{4,10} 여기에 methotrexate를 첨가하였을 경우에는 시간이 지날수록 더 감소하는 결과를 보였다. 이번 실험에서는 어떤 암세포 군에서는 2일째가 가장 많이 감소하기도 하였으며 어떤 암세포 군에서는 3일째까지 감소하였다. 그에 비하여 정상세포인 림프구는 아산화질소의 노출 시간이 증가할수록 성장의 억제가 의미있게 감소하였다. 다른 연구와는 달리 이번 실험에서는 압력을 증가시켰다. 압력이 증가함에 따라 산소의 압력이 증가하는 것이 세포의 성장을 촉진하는 것을 배제하기 위하여 동일하게 전체 압력을 2기압을 유지하면서 산소의 압력을 다르게 하였다. 두 군에서 세포성장 속도 변화에 유의한 차이가 없는 것으로 보았을 때 산소의 농도 변화가 세포성장에는 영향을 주지 않는다고 할 수 있다.

Methotrexate는 dihydrofolate reductase inhibitor로써 thymidylate의 생성을 방해하여 DNA생성을 억제하여 세포의 성장을 억제한다. Methotrexate를 단독으로 투여한 경우에는 두 세포군 모두에서 농도가 증가함에 따라 의미 있게 억제

가 이루어졌다. 아산화질소와 methotrexate를 투여한 경우에는 양 군 모두에서 세포의 억제 현상이 일어났다. 여러 연구에서 아산화질소와 methotrexate를 같이 사용하였을 때 세포성장의 억제가 더 증가한다는 것을 보인다.¹²⁻¹⁵ 아산화질소와 methotrexate의 투여 시기에 따라 억제 효과는 다른 결과를 보인다. 이는 methotrexate는 dihydrofolate reductase를 불활성화함으로써 DNA 생성을 억제하지만 그와 함께 5-methyl-THF가 감소되고 MTX polyglutamate들이 축적되면서 methionine synthase의 활동을 억제하기 때문에 아산화질소와 유사한 결과를 보인다. 그러므로 아산화질소를 먼저 투여하거나 동시에 투여하는 경우에는 이러한 효과로 인해 상승효과를 나타낸다. 하지만 아산화질소보다 MTX를 먼저 투여한 경우에는 MTX의 이런 작용이 먼저 일어나기 때문에 아산화질소를 투여하여도 어떤 변화가 일어나지 않는다. 이번 실험에서는 methotrexate가 첨가된 배지에 세포를 배양하면서 동시에 아산화질소에 노출을 하였다. 아산화질소와 methotrexate를 단독으로 투여한 경우 모두 세포성장의 억제 효과가 있으며 그 정도는 아산화질소보다 methotrexate에서 성장을 더 억제하는 결과를 보였다. 각기 다른 농도의 methotrexate 배지에 아산화질소를 노출하였을 때에는 두 군 모두에서 세포 성장 억제 효과가 있었다. 다른 연구에서는 IC_{50} 를 0.2-0.3 μ M로 정했는데 1 μ M 이상이 첨가되면 24시간 이후에 생존한 세포가 없다고 하였다. 이번 연구에서는 세포의 성장이 50% 이하로도, 어떤 일정한 형태로 감소하지 아니하였다.

CO_2 배양기와 고압의 아산화질소 탱크에서 각각 암세포와 림프구를 배양하였는데 특이한 것은 아산화질소의 정상세포에 대한 성장 억제 효과는 암세포와 같은 정도의 성장 억제 효과를 보이는 것이었다. 배양기와 고압 아산화질소 탱크에서 암세포와 림프구를 배양한 후에 배양후의 세포수를 배양전의 세포수로 나누어 성장률을 산출하면 정상세포가 암세포보다 더 억제된 것으로 나타난다. 그러나 두 세포 사이의 성장 속도가 다르므로 고압 아산화질소 탱크에서의 성장률을 배양기의 성장률에 대한 비율로 표현해보면 두 군 모두에서 유사하게 성장의 억제가 일어난 것을 볼 수 있다. 이 세포 성장 억제율도 기압에 따라 영향을 받지 아니하였고 시간과 methotrexate에는 영향을 받았다. 위의 결과를 종합해 보면 아산화질소를 1기압에서 2일 동안 노출시키는 것이 정상세포에 대한 억제를 최소화하면서 암세포를 억제할 수 있는 조건이다. 여기에 methotrexate를 같이 투여하거나, 투여 2일 전 아산화질소를 투여하는 것이 가장 이상적인 억제방법이라고 생각한다. 하지만 이런 결과를 정확히 알기 위해서는 앞으로 동물 실험을 통하여 각 장기에 대한 영향을 알아보고 어떤 농도에서 부작용을 유발하는지를 알아보아야 할 것이다. 또한 이와 함께 folate의 대사

물에 대한 정밀한 검사가 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. O'Sullivan H, Jennings F, Ward K, McCann S, Scott JM, Weir DG: Human bone marrow biochemical function and megaloblastic hematopoiesis after nitrous oxide anesthesia. *Anesthesiology* 1981; 55:645-9.
2. Kroes AC, Lindemans J, Hagenbeek A, Abels J: Nitrous oxide reduces growth of experimental rat leukemia. *Leuk Res* 1984; 8: 441-8.
3. Banerjee RV, Matthews RG: Cobalamin-dependent methionine synthase. *F J* 1990; 4: 1450-9.
4. Foschi D, Rizzi A, Zighetti ML, Bissi M, Corsi F, Trabucchi E, et al: Effects of surgical stress and nitrous oxide anesthesia on peri-operative plasma levels of total homocysteine: a randomized, controlled study in general surgery. *Anaesthesia* 2001; 56: 676-9.
5. Lumb M, Perry J, Deacon R, Chanarin I: Changes in plasma folate levels in rats inhaling nitrous oxide. *Scand J Haematol* 1981; 26: 61-4.
6. Kano Y, Sakamoto S, Sakuraya K, Kubota T, Kasahara T, Hida K, et al: Effects of nitrous oxide on human cell lines. *Cancer Res* 1983; 43: 1493-6.
7. Ermens AA, Kroes AC, Schoester M, van Lom K, Lindemans J, Abels J: Effect of cobalamin inactivation of folate metabolism of leukemic cells. *Leuk Res* 1988; 12: 905-10.
8. Ermens AA, Vink N, Schoester M, van Lom K, Lindemans J, Abels J: Nitrous oxide selectively reduces the proliferation of the malignant cells in experimental rat leukemia. *Cancer Lett* 1989; 45: 123-8.
9. Abels J, Kroes AC, Ermens AA, van Kapel J, Schoester M, Spijkers LJ, et al: Anti-leukemic potential of methyl-cobalamin inactivation by nitrous oxide. *Am J Hematol* 1990; 34: 128-31.
10. Horne DW, Holloway RS: Compartment of folate metabolism in rat pancreas: nitrous oxide inactivation of methionine synthase leads to accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in cytosol. *J Nutr* 1997; 127: 1772-5.
11. Koblin DD: Nitrous oxide: a cause of cancer or chemotherapeutic adjuvant? *Semin Surg Oncol* 1990; 6: 141-7.
12. Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H: Folate depletion induced by methotrexate affects methionine synthase activity and its susceptibility to inactivation by nitrous oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1305-11.
13. Ermens AA, Schoester M, Spijkers LJ, Lindemans J, Abels J: Toxicity of methotrexate in rats preexposed to nitrous oxide. *Cancer Res* 1989; 49: 6337-41.
14. Ermens AA, Schoester M, Lindemans J, Abels J: Effect of nitrous oxide and methotrexate on folate coenzyme pools of blast cells from leukemia patients. *Leuk Res* 1991; 15: 165-71.
15. Kroes AC, Lindemans J, Schoester M, Abels J: Enhanced therapeutic effect of methotrexate in experimental rat leukemia after inactivation of cobalamin (vitamin B₁₂) by nitrous oxide. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986; 17: 114-20.
16. Kroes AC, Ermens AA, Lindemans J, Abels J: Effects of 5-fluorouracil treatment of rat leukemia with concomitant inactivation of cobalamin. *Anticancer Res* 1986; 6: 737-42.
17. Kroes AC, Lindemans J, Abels J: Synergistic growth inhibiting effect of nitrous oxide and cycloleucine in experimental rat leukemia. *Br J Cancer* 1984; 50: 793-800.
18. Gonsowski CT, Eger EI 2nd: Nitrous oxide minimum alveolar anesthetic concentration in rats is greater than previously reported. *Anesth Analg* 1994; 79: 710-2.
19. Russell GB, Snider MT, Richard RB, Loomis JL: Hyperbaric nitrous oxide as a sole anesthetic agent in humans. *Anesth Analg* 1990; 70: 289-95.