

시험관내의 인체폐암 세포 A549의 방사선 및 5-Fluorouracil에 대한 효과

한양대학교 의과대학 치료방사선과학교실

이 명 자

버지니아 의과대학 치료방사선과

전 하 정

연세대학교 의과대학 미생물학교실

이 원 영

The Effect of 5-FU and Radiation on A549 Cells *In Vitro*

Myung Za Lee, M.D., Ha Chong Chun, M.D.* and Won Young Lee, Sc.D.**

Department of Radiation Therapy, Hanyang Univierity Hospital, Seoul, Korea

*Department of Radiation Oncalogy, Medical College of Virginia, Richmond, Virginia, U.S.A.

**Department of Microbiology, Yonsei Medical College, Seoul, Korea

Effects of ionizing radiation alone and combined with chemotherapy on tumor growth and it's clonal specificity monitored by changes in distribution of chromosome number were studies in A549 cell line originated from human adenocarcinoma of the lung.

Radiation (300 rad, 600 rad and 900 rad) were delivered with or without 5-FU. Forty eight hours later, 57.5% of growth inhibition of cell was seen in cells treated with 5-FU concentration of 0.4 μ g/ml for 24 hr exposure. Cell survival curves after radiation with and without 5-FU were made. Chromosomal analysis of cells in metaphase in control, and in cells treated with 300 rad of radiation, or 0.4 μ g/ml of 5-FU treatment, and combined treatment of both were done to examine the changes in ploidy and number of chromosome.

Radiation combined with 5-FU enhanced growth inhibition of A549 cells. However, no evidence of synergetic effects in growth inhibition was observed in the cells treated with the combination therapy.

Pattern of chromosomal distribution of survived cells were shifted from hyperploidy to hypoploidy by single dose of radiation (300 rad). As radiation dose increased a large number of hypoploidy cells were observed. Following treatment of cells with 5-FU, chromosomal distribution of survived cells were also shifted to hypodiploidy, which were seen in cells treated with radiation. The cell treated with 5-FU and followed by radiation within 24 hrs had cell with increased number of hypodiploidy cells.

Almost same type of chromosomal changes were reproduced in cells treated with combined treatment with radiation and 5-FU. Minor differences were that cells with fewer number of chromosome were more frequent in cells treated with combined therapy. Further increase in cells of hypoploidy (93%) having 1~10 chromosome were induced by additional radiation. Therefore, the enhanced therapeutic effect of 5-FU combined with radiation of A549 cells appeared to be additive rather than synergistic.

Key Words: 5-FU, A549 cell, Ploidy, Combined radiation and chemotherapy, Heterogeneity

서 론

종양세포집단의 이질성은 잘 알려져 있으며 암세포의 세포유전자는 불안정하여 핵형, 형태, 종양성, 성장성, 항원성, 전이능력, 호르몬의 수용체등에서 이질성이 증명되었고¹⁻¹³⁾ 이러한 이질성은 외부환경의 변화에 따라 소집단의 구성비율도 다양하여 영양상태⁷⁾, 숙주자체의 면역기능을 여러가지 약물치료에 의한 감수성의 차이¹⁴⁻¹⁹⁾ 및 방사선 치료에 의한 감수성의 차이등으로 표현된다^{20,21)}. 이러한 이질성으로 인하여 예상밖의 치료효과를 가져와 암환자를 완치시킬 수 없는 요인중의 하나로 고려될 수 있다²²⁾.

종양세포 집단의 다양성은 유전자형의 변이에 의해 일어나며 숙주 내에서 종양성장이 진행됨에 따라 계속 변화되어 궁극적으로 정상과는 완전히 그 유형이 달라진다⁷⁾. 종양세포의 DNA 양도 대부분이 비배수성(aneploidy)의 세포로 구성되어 있음이 밝혀졌다²³⁾. 종양의 치료방법은 효과적인 치료를 위해 끊임없이 연구되어 왔으며 근래에는 방사선요법과 항암제 요법을 병용함으로써 일부 암에서 완치율을 증가시키고 있다. 이는 종양세포의 항암제 감수성의 이질성에 기인되며 즉 각각의 암세포 마다 항암제에 대한 감수성이 다르며 어떤 요법후 살아 남는 세포가 있으며 이들 내성세포의 종양성이 환자의 예후 판정에 문제가 된다. 방사선 조사후에도 살아남는 세포의 종양성 또한 달라서 Richard 및 Atkin등은 자궁경부암 환자를 방사선 치료후 염색체의 배수성을 관찰하여 이들 남은 세포가 방사선에 대한 저항이 증가되었다고 보고하였다.²⁴⁾

방사선 및 5-FU는 DNA에 직접 작용하여 암세포를 파괴하며 방사선 및 5-FU를 병용하며 5-FU가 방사선의 감각제 역할을 한다고 보고되었다^{25,26)}. 이는 실제 임상적으로도 널리 쓰이며 5-FU 약제와 방사선의 병용요법으로 위암, 췌장암, 직장암등 선암에서 환자의 생존율을 향상시켰다²⁷⁻²⁹⁾. 같은 방법으로 항문암, 구강암, 식도암등 편평상피암 치료에 있어서도 치료반응도 및 환자생존율이 증가되었다고 보고하였다³⁰⁻³²⁾.

위와같은 사실로 미루어 볼 때 5-FU에 의해 방사선 감작세포의 증대가 병합치료효과를 좌우했다고

할 수 있다. 그러나 5-FU 치료와 방사선치료가 표적하는 세포가 일정한 특성을 공유하는 동일집단인지의 여부는 밝혀져 있지 않다. 이들이 동일집단일 경우 병용요법의 우선순위 결정에 중요한 인자가 될 것이다.

본 연구에서는 인체 폐암세포 A549에서 염색체 배수성의 이질성을 이용하여 5-FU 처리, 방사선조사 혹은 5-FU 및 방사선 조사에 의한 표적세포집단이 동일한지 혹은 다른지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 종양 세포

ATCC (Maryland, U.S.A.)에서 공급받은 human lung cancer에서 유래한 A549 culture cell line을 사용하였다. 이세포는 세포용기의 바닥에 붙어 단일층(monolayer)으로 배양되며 배양 7일만에 15배 정도의 세포수로 증가된다. Plating efficiency는 48% 정도다. 염색체 분포는 44~120개의 배수성을 보이며 염색체수 52~55를 갖는 세포가 주종이다³³⁾.

2) 세포 배양액

배양액은 RPMI 1640 (Flow Lab. U.S.A.) 배지에 15% 우태아혈청(GIBCO, U.S.A.)과 penicillin 100 I. U./ml, streptomycin 100 μ g/ml을 첨가하여 사용하였다.

3) 배양 용기

A549세포의 stock culture에서는플라스틱 용기 (Corning, U.S.A.)를 사용하였고 그외의 실험에서는 petri dish (Corning, U.S.A.)를 사용하였다.

4) 약제

5-Fluorouracil (한국 Rosche Co.)의 50 mg/ml인 농도를 원액으로 한후 사용시 원하는 농도로 배양액에 희석하여 사용하였다.

5) Colcemid

냉동건조된 colcemid (GIBCO, U.S.A.)를 멸균된 증류수를 넣어 녹인 후 마지막 농도가 0.6 μ g/ml로 조정 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 약제 감수성 검사

배양된 세포 1×10^6 에 5-FU를 농도별로 넣고 24시간 처리한 후 약제가 없는 새로운 배지로 갈아 주고 다시 24시간 배양한 후 trypan blue를 사용하여 살아 남는 세포의 수를 세어 약제 감수성 정도를 % growth inhibition으로 나타내었다³⁴⁾. 즉 대조군의 평균세포수와 실험군의 평균세포수의 비에 100을 곱한 값을 % surviving cell로 산정하여 growth inhibition 정도를 백분율로 환산 표시 하였다³⁴⁾.

2) 방사선 조사

5000 Curie의 코발트-60 동위원소를 방사선 발생원으로 이용하여 SSD 80 cm 거리에서 $10 \times 10 \text{ cm}^2$ 의 조사야에 분당 선량율은 157 rad였다.

3) 방사선 조사에 의한 생존세포를

대조군과 방사선 300 rad, 600 rad 및 900 rad를 조사한 후 48시간, 72시간 및 120시간에 생존세포수를 측정하였다. 이때의 생존세포수의 측정은 배양용기 바닥에 붙어있고 위상차 현미경소견으로 살아있다고 판정되는 세포를 산정하여 mm²면적당 세포수를 구하여 플라스틱 용기의 전체 면적으로 환산하여 전체 세포수를 구하였다.

4) 방사선 조사 및 5-FU 처리에 의한 세포생존을

대조군과 방사선 300 rad, 600 rad 및 900 rad를 조사한 후에 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 의 5-FU 처리시작 48시간, 72시간 및 120시간에 생존세포수를 세어 대조군과 비교하였다.

5) 염색체 관찰

관찰대상 세포수를 1×10^6 로 조정된 세포를 a) 대조군, b) 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 처리군, c) 5-FU+방사선 300 rad조사군, d) 방사선 300 rad 단독조사군, e) 300 rad 방사선조사후 300 rad 방사선을 24시간후에 재조사한 군, f) 5-FU와 방사선조사를 동시에 한 군, g) 5-FU와 방사선을 동시에 준후 다시 방사선 300 rad을 24시간에 재조사한 군등 7군으로 나누어 실험하였다. 충분한 분열중기의 세포수를 얻기 위해 각실험 시작후 120시간에 염색체를 관찰하였다.

염색체 표본제작은 colcemid 용액(0.6 $\mu\text{g/ml}$) 첨가후 37°C에서 2시간 배양하였다. 이들 세포를 수거해서 1000 rpm으로 5분간 원심분리후 37°C에서 미리 가온한 0.075 MKCL 저장액을 넣어 세포용해를 유도하였다. 이것을 다시 5000 rpm에서 5분간 원심분리후 저장액을 제거한 다음 고정액을 서서히 가

한후 4°C에서 1시간 정치한 다음 원심분리를 이용하여 다시 새로운 고정액으로 세번 세포를 세척해 주었다. 고정액을 버리고 4°C에 보관된 slide에 Rothfels 및 Siminovicth의 공기 건조법³⁵⁾에 따라 염색체 표본을 만들어 Giemsa 염색액으로 20분간 염색후 영구표본을 제작하여 100개의 분열 중기세포를 세어 염색체 수의 분포도를 백분율로 나타내었다.

실 험 성 적

1. 항암제 및 방사선처리후 세포성장곡선의 변화

1) 5-FU 단독처리군의 세포성장율의 변화

세포생존율이 95%이상되는 A549 cell에 0.4 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 5-FU를 24시간 처리하여 Table 1 및 Fig. 1과 같은 성장곡선으로 표현되었으며 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 57.5% 성장억제율을 나타내었다. 약의 농도가 높을수록 성장억제율은 증가되어 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 78.3%의 성장

Table 1. Effect of 5-FU Concentration on A549 Cells for Exposed 24 hr in vitro

Drug Concentration	cell count (x 2000)	% survival	% growth inhibition
Control	318		
0.4 μg	135	42.5	57.5
1 μg	120	36.6	62.3
2 μg	100	31.4	68.6
5 μg	69	21.7	78.3

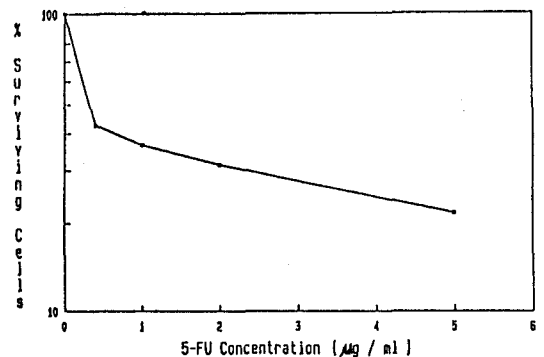


Fig. 1. Effect of 5-FU concentration for 24 hr exposure. Cell count was done 24 hr after removal.

Table 2. Effect of Radiation on A549 Cells in vitro

Rad dose	Number of cells survived after exposure (x2000)			
	24hr	48hr	72hr	120hr
Control	100	200	350	1560
300 rad	59 (41)	115 (42.5)	87 (75.1)	176 (88.7)
600 rad	46 (54)	53 (73.5)	65 (81.4)	64 (95.9)
900 rad	42 (58)	42 (79.0)	43 (87.7)	59 (96.2)

() : % growth inhibition

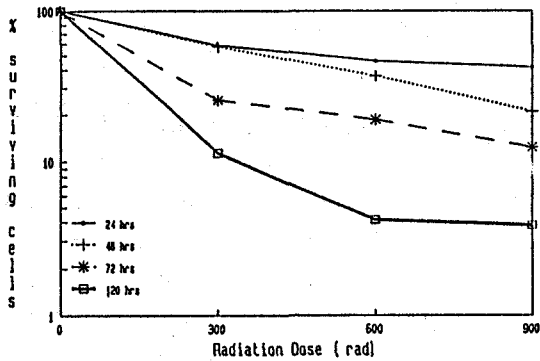


Fig. 2. Effect of radiation on various cell count times.

억제율을 보였다. 본 실험의 목적에 부합되는 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 선택하여 다음 실험에 표준용량으로 결정하였다.

2) 방사선 단독처리군의 세포생존율

방사선조사량이 클수록 성장억제율이 증가되었고 (Table 2 및 Fig. 2) 방사선조사후 시간이 경과될수록 성장억제율이 증가되었다. 약물과 방사선조사를 병용하는 실험을 위해 48시간에 42.5% 성장억제율을 나타내는 방사선량 300 rad를 택하였다.

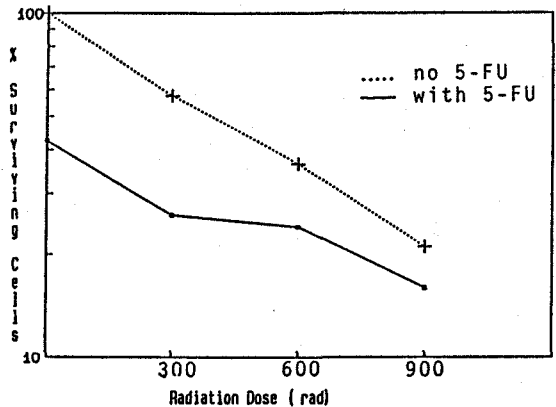


Fig. 3. Effect of combination of radiation plus 5-FU. Cell count was done 48 hr after treatment.

3) 5-FU 및 방사선 병합

처리군의 세포생존율 약물처리 및 방사선조사를 같이하였을 때 실험 시작후 48시간, 72시간 및 120시간 경과때의 세포수를 세어본 결과 (Table 3 및 Fig. 3, 4) 방사선 단독조사보다 약물처리를 병용하였을 때 성장억제 효과가 약간 컸다. 약물처리 및 방사선조사를 한 군에서 방사선 단독조사보다 경사도

Table 3. Effect of Radiation and 5-FU on A549 in vitro

Rad dose + 5-FU (0.4 ug)	Number of after exposure (x2000)		
	28hr	72hr	120hr
Control	200	350	1560
No radiation	85 (57.5)	88 (74.9)	118 (92.4)
400 rad + 5-FU	52 (74)	51 (85.4)	55 (96.5)
600 rad + 5-FU	48 (76)	51 (86.3)	50 (96.8)
900 rad + 5-FU	32 (84)	31 (91.1)	40 (97.4)

() : % growth inhibition

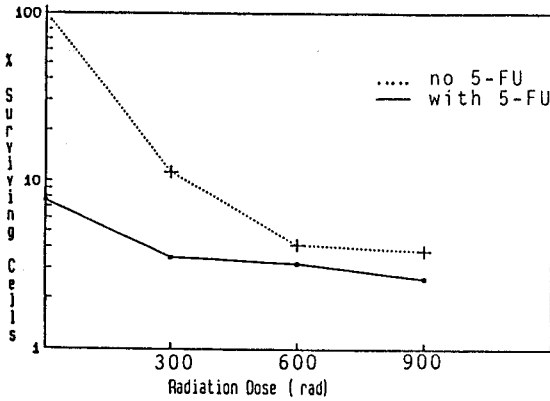


Fig. 4. Effect of combination of radiation plus 5-FU. Cell count was done 120 hrs after treatment.

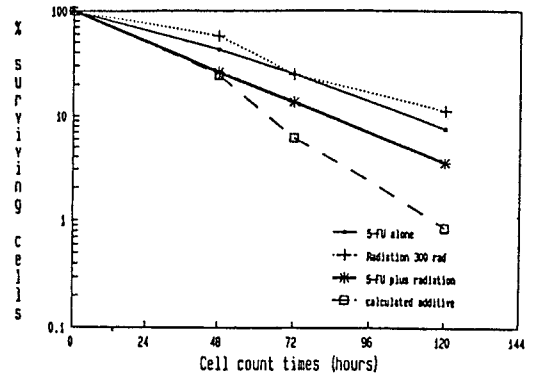


Fig. 5. Effect of single dose of radiation 5-FU, 5-FU plus radiation as a function of cell count times.

Table 4. Effect of 5-FU, Radiation and Combination on A549 Cells in vitro

Type of treatment	Number of cell after exposure (x2000)		
	48 hr	72 hr	120 hr
Control	200	350	1560
5-FU, 0.4 µg/ml	85 (57.5)	88 (74.9)	118 (92.5)
Radiation 300 rad	115 (42.5)	87 (75.1)	176 (88.7)
5-FU plus radiation	52 (74)	51 (86.3)	55 (96.5)

() : % growth inhibition

의 차이는 인정할 수 없이 세포 독성의 증가효과만 관찰할 수 있었으나 병합치치후 세포독성의 증가 효과는 방사선 조사 및 약물처리 시작후 48시간에서 가장 컸다. 그 이후로는 감소되었다(Table 4 및 Fig. 5).

2. 생존세포의 염색체수의 변화

A549 세포의 염색체수의 분포범위는 11~130개였고 염색체 집단으로 2배체 이상이 84%였다. 2배체 이하는 16% 2배체와 4배체 사이의 수는 81% 4배체 이상은 3%로 2배체 이상이 단연 많았고 61~70개의 염색체가 주종을 이루었다(Table 5 및 Fig. 6).

시험관내에서 방사선 300 rad를 조사한 후 염색체수의 분포범위가 넓어져 1~240개였으며 방사선조사 이전에 없었던 8배체의 염색체가 나타나며 2배체에서 4배체 사이의 염색체 분포도가 방사선조사 전에는 81%였으나 300 rad조사후 20%로 감소하였고

주로 2배체 이하의 분포양상으로 바뀌었다. 즉 1~50개의 염색체 분포가 72%였으며 주중세포는 21~30개였다(Table 5 및 Fig. 6).

방사선을 300 rad 조사한후 24시간후에 다시 한번 300 rad조사했을 때 2배체 이하의 염색체 분포는 더욱 증가되어 93%로 되었으며 주중세포는 1~10개였다(Table 5 및 Fig. 6).

5-FU 처리후 24시간 후에 방사선을 조사하여 같은 변화를 관찰할 수 있었다. 1~10개의 분포도가 단독 처리군보다 증가하였다. 방사선 및 5-FU를 동시에 처리한 군은 분포가 1~150개로 6배체 이하였으며 2배체이하가 81%로 방사선을 24시간후에 조사한 군과 비슷한 양상을 보였다(Table 7 및 Fig. 8).

결과적으로 방사선조사에 의한 세포집단의 변화는 염색체 배수성 2배체에서 4배체사이 수를 갖는 세포 집단이 급격히 감소되었고 방사선조사후 생존세포의 염색체수는 2배체 이하의 세포 집단으로 변화되었

Table 5. Distribution of Chromosome Number of A549 Cells in vitro

Number of chromosome	Control		300 rad		300 rad + 300 rad	
	No. of cells	%	No. of cells	%	No. of cells	%
1 - 10	2		9	9	31	31
11 - 20	2	2	25	25	25	25
21 - 30	6	6 16%	24	24 72%	20	20 93%
31 - 40	4	4	10	10	12	12
41 - 50	4	4	4	4	5	5
51 - 60	25	25	8	8	22	2
61 - 70	54	54	4	4	1	1
71 - 80	11	1 81%	3	3 20%	2	2 7%
81 - 90	1	1	44	4	2	2
91 - 100			1	1		
101 - 110			1	1		
111 - 120	1	1 3%	2	2 3%		
121 - 130	2	2				
131 - 140						
141 - 150						
151 - 160						
151 - 170						
171 - 180						
181 - 190			2	2 2%		
191 - 200						
201 - 210			2	2		
211 - 220						
221 - 230				3%		
231 - 240						
241 - 250			1	1		

다. 5-FU 처리도 또한 2배체에서 4배체사이의 염색체를 갖는 세포의 감소를 보여 약물 및 방사선에 선택적으로 작용받는 세포의 염색체 배성특징은 2배체에서 4배체 사이 집단으로 간주되었으며 5-FU 및 방사선을 함께 처리 하였을 때도 동일집단에 세포독성이 작용함을 인정할 수 있었다.

고 찰

5-FU는 1957년에 개발된 항암제로 antimetabolite 군에 속하며 세포의 uracil의 이용을 방해하기 때문에 세포는 2-deoxyuridine 5'-phosphate를 thymi-

dine 5-phosphate로 변화시키지 못하여 thymidine의 결핍이 일어나 DNA의 합성의 장애가 세포독성기전으로 알려졌다. 이 약제는 주로 S-phase에 있는 세포에 작용하여 세포생활환이 진행되지 못해 세포가 죽게된다^{36,37}. 이외에도 5-FU는 RNA에 작용하여 큰분자 RNA precursor를 작은 분자로 변화시키고 mRNA polyadenylation 작용을 방해하여 세포 RNA를 불안정하게 한다³⁸. 본 약물에 대한 감수성은 지수성장기의 세포가 정치기의 세포보다 큰 것으로 보고되었다³⁹. 어떤 경우의 암세포는 uracil analogue의 대사가 저해되어 정상조직 보다 암세포에 오래 정지할 수 있다고 보고하였다⁴⁰. 5-FU는 생체내에서는

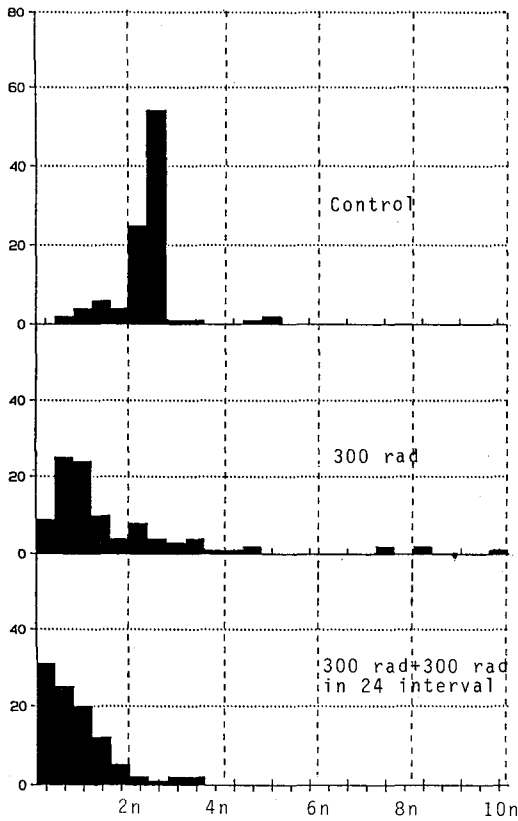


Fig. 6. Change in distribution of chromosome number on A549 cells in vitro after single and two dose of radiation.

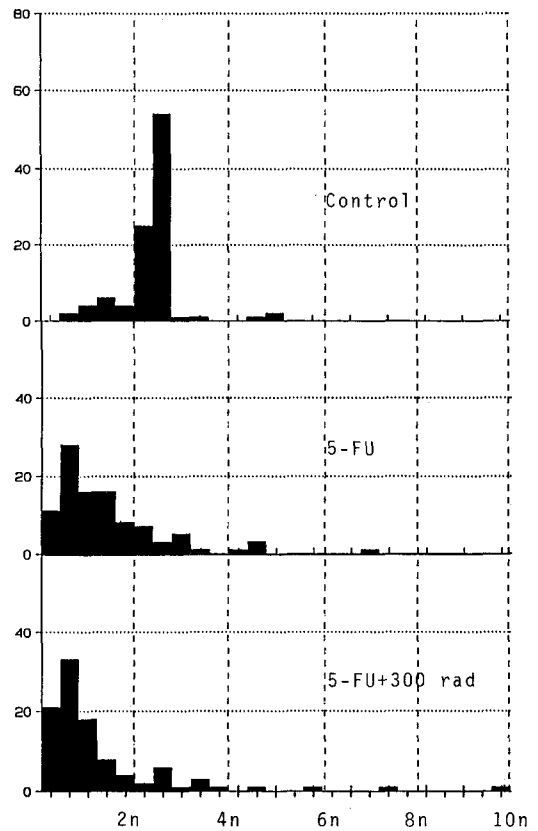


Fig. 7. Change in distribution of chromosome number on A549 cells in vitro after treatment with 5-FU and 5-FU followed by 300 rad of radiation.

혈중 반감기가 짧아 15분 이내며 간에서 대사된다^{41,42)}. 생체내의 혈중농도는 30 mg/kg를 투여하였을 때 100~400 ng/ml의 농도가 되며 1 μ g/ml정도가 되면 부작용이 매우크다고 보고되고 있다^{43,44)}. 이 제제는 단독으로 항암효과가 있을 뿐 아니라 방사선과 병용함으로써 암치료 효능이 증감됨을 1958년에 보고하였고⁴⁵⁾ 그후 Sarcoma 180, Adenocarcinoma, Hela cell등에서는 5-FU가 방사선에 대한 감수성을 증가시킨다고 보고하였다^{46~49)}. 임상적으로 소화기 계통의 암인 위암, 대장암, 직장암, 췌장암등의 선암에 많이 쓰이며 구강암, 식도암 항문암등 편형상피세포암에 방사선과 함께 치료하여 환자의 생존율을 증가시켰다^{27~32)}. 이에 반하여 다른 저장들은 이 두가지를 병용하여 큰 효과가 없었다고 보고하였다^{50~53)}. 방사선 및 5-FU의 병용시 투여순서가 매우

중요하며 방사선을 준 후에 5-FU를 처치해야 방사선에 대한 반응이 증가되며 5-FU를 먼저 주면 방사선에 대한 반응을 증가시키지 않는다고 대부분의 저자들은 일치된 보고를 하였다^{26,41,47,48)}. 또한 방사선에 대한 세포의 치사는 DNA에 주로 작용하여 DNA의 single strand나 double strand의 절단으로 세포분열이 안되어 세포가 죽게된다. 방사선을 받은 세포는 세포분열의 지연현상을 일으키며 방사선량이 증가할수록 분열지연 현상이 증가되며 DNA 합성량도 감소되어 G2기의 세포들이 축적된다. 방사선으로 인한 세포손상이 회복되면 세포는 다시 분열기에 들어간다. 방사선은 세포에 치사손상 및 준치사손상을 일으키며 준치사 손상은 2~4시간에 회복이 된다⁵⁴⁾. 준치사 손상의 회복으로 같은 양의 방사선조사를 하더라도 단일조사 때와 분할조사 때의 생존율에 커다

Table 6. Change in Distribution of Chromosome Number of A549 Cells in vitro after Treatment with 5-FU Followed by Radiation

No. of chromosome	5-FU		5-FU followed by RT*		
	No. of cells	%	No. of cells	%	
1 - 10	11	11	21	21	
11 - 20	28	28	33	33	
21 - 30	16	16	18	18	84%
31 - 40	16	16	8	8	
41 - 50	8	8	4	4	
61 - 60	7	7	2	2	
71 - 70	3	3	6	6	
71 - 80	5	5	1	1	13%
81 - 90	1	1	3	3	
91 - 100			1	1	
101 - 110	1	1			
111 - 120	3	3	1	1	2%
121 - 130					
131 - 140					
141 - 150			1	1	
151 - 160					
161 - 170					
171 - 180	1	1			1%
181 - 190			1	1	
191 - 200					
201 - 210					
211 - 220					
221 - 230					
231 - 240					
241 - 250			1	1	1%

* radiation was followed in 24 hour after 5-FU treatment

란 차이를 보인다.

본 실험에서도 5-FU 처리나 방사선처리 후에 생존 세포가 존재하였으며 관찰기간 동안 계속하여 다시 증식하는 현상을 관찰하였다. 이들 잔존세포의 염색체수를 기준하여 생존세포의 특성을 규명하였다.

A549 세포는 시험관에 오래동안 계대된 기타 암세포와 마찬가지로 염색체수가 다양한 세포의 집단이다. 염색체수의 다양성은 세포융합, 내재복제, 분열, C-mitosis, restitution, nondisjunction 등에 의하여 나타나며 수개에서 수백개에 이르기까지 나타날 수 있다⁵⁵⁻⁵⁷). 내재복제과정에서 유사분열이 없이 염

색체 배수성이 증가되며 핵의 부피도 커지면서 거대 세포가 형성된다⁵⁸). 내분열은 형성되지 않고 핵막이 소실되지 않기 때문에 두배수의 염색체를 가진 단일 핵이 형성됨으로 생긴다. C-mitosis는 내분열 보다 정상에 가까운 현상으로 정상적인 간기와 전기후에 핵막이 소실되지만 방추사가 형성되지 않기 때문에 염색체는 세포질 내로 흩어지게 되어 두배수의 염색체를 갖는 단일핵이 만들어지거나 소수의 염색체로 구성된 micronuclei가 형성된다. Restitution은 어느 시기까지는 정상적인 분열과정을 거치나 중기나 후기에 염색체가 분리되지 않고 두배수의 염색체를 가

Table 7. Changes in Distribution of Chromosome Number on A549 Cells in vitro After Treatment with Combined Radiation Plus 5-FU and Radiation plus 5-FU Followed by 2nd Dose of Radiation

No. of chromosome	Radiation +5-FU		Radiation 5-FU followed by 2nd dose of radiation	
	No. of cells	%	No. of cells	%
1 - 10	24	24	45	45
11 - 20	23	23	25	25
21 - 30	16	16	10	10
31 - 40	9	9	7	7
41 - 50	9	9	6	6
51 - 60	3	3	3	3
61 - 70	4	4	2	2
71 - 80	3	3		
81 - 90	1	1	1	1
91 - 100	2	2		
101 - 110				
111 - 120	5	5		
121 - 130				
131 - 140		6%		1%
141 - 150	1	1		
152 - 160			1	1

진 핵을 형성하게 된다. Hypoploidy는 C-mitosis, 불분리현상, 또는 중심체가 3개 이상으로 분열하는 다극현상에 의해서 나타날 수 있다⁵⁹⁾. 불분리현상은 후기에 중심체가 나누어 지지 않은 상태로 남아있기 때문에 한염색체의 두개의 염색분체가 같은 쪽으로 이동하여 monosomic cell과 trisomic cell이 나타나게 된다. monosomic cell은 장기간 생존에는 불리하지만 두번 세번의 불분리현상에 의해 hyperdiploidy로 변할 수 있고 생성된 4배체는 계속적으로 2배체의 세포를 생성할 수 있다. monosomic cell은 혼하지 않다.

본 실험에 사용된 A549 세포는 1~130개의 염색체 분포를 보여 생쥐 육종세포보다 그 범위가 좁았고 생쥐 임파종 세포보다 범위가 넓었다^{60,61)}. 약제나 방사선에 대한 감수성은 세포의 유전형에 의해 결정되어 표현되므로 감수성과 염색체의 수와 관계가 있다. 5-FU에 대한 염색체 변이와 염색체 수의 변화에 대해 특별히 연구된 것은 없었다. 최근 flow cytometry로 종양세포의 DNA 함량에 대한 연구가 활발히 진행되어 DNA의 index와 배수성과의 관계도 알 수

있고 배수성의 변화는 병기 및 조직학적 분화도와 관련이 있고^{23,62)} 환자의 예후와 밀접한 관계가 있다고 보고 하였다^{63,64)}.

방사선조사에 의해서도 염색체 이상의 빈도가 높아지며 deletion, ring, dicentric, anaphase bridge 등이 생기며 염색체 이상이 많을 수록 세포의 생존은 낮아진다⁶⁵⁻⁶⁷⁾. 즉 이상세포는 대부분 살아남지 못한다. 높은 배수성을 나타내는 세포들은 불안정한 세포분열로 생존율이 미약하다고 볼 수 있다, 즉 분열능력이 낮은 세포는 분열현상이 완료되지 못할 때 높은 배수성을 나타낸다고 할 수 있으며 이와같은 배수성의 차이와 그 특성은 암세포의 종류에 따라 다르며 약물치리나 방사선조사후 시간에 따라 다시 변할 수 있다. Richard등은 자궁암 환자에서 방사선을 준후 대부분 환자는 배수성이 증가하였고 일부에서는 배수성이 감소하는 경향을 보였다²⁴⁾. 방사선 처치를 한 생쥐육종에서 배수성의 증가 혹은 감소 현상 모두가 관찰되었다⁶⁰⁾. 본 실험에서는 2배체이하 세포의 증가현상을 관찰할 수 있으며 주로 pulverization 현상으로 방사선을 받은 간기의 염색체가 세포분열을

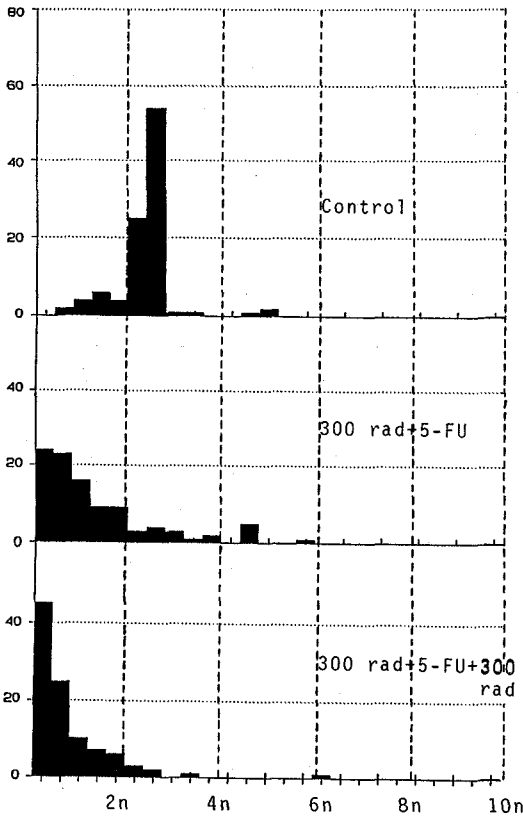


Fig. 8. Change in distribution of chromosome number on A549 cells in vitro after treatment with combined radiation (300 rad) plus 5-FU and radiation plus 5-FU followed by 2nd dose of radiation (300 rad).

하지 못하고 방추사가 생기지 않아 hypoploidy로 나타났다고 추정된다. 이는 생존세포의 염색체 특성은 기존세포에 선택작용을 한 것이라기 보다는 방사선에 의한 염색체 변형으로 볼 수 있다.

심우남등은 CCNU 및 BCNU를 NS-1 세포에 처리하였을 때 염색체의 배수성의 변화는 별로 크지 않았다고 보고하였다⁶¹⁾. 본 실험에서 5-FU를 주었을 때 염색체 범위는 2 배체에서 4 배체사이 군이 감소되었고 2 배체 이하군이 증가됨을 볼 수 있어 방사선에 의한 변화와 비슷하였다. 그의 방사선 조사후 대조군에 없던 6 배체 이상의 염색체가 나타났으며 염색체의 범위도 대조군보다 컸다.

위 실험에서 방사선 및 5-FU를 병용하였을 때 특히 48시간 이내에서 방사선 단독 조사보다 5-FU 병

합의 경우 감수성이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 5-FU가 방사선작용을 증가시키는 기전은 잘 알려지지 않았으나 본 실험에서는 타연구자들이 보고한 바와 같이 방사선을 처리하고 이어서 5-FU를 24시간 처리하여 방사선조사 및 5-FU의 병합 처치에 따른 감수성을 높이려고 하였다. 5-FU를 방사선 조사후 10~18시간내 주면 효과가 증가됨이 보고되었고^{47~49,68)} 5-FU를 먼저 주었을 때 대부분 저자들이 증가 효과가 없다고 보고를 하며 이는 5-FU의 독성 효과와 방사선독성효과의 표적세포가 겹쳐 증가효과가 없을 것으로 설명하고 있다⁴⁹⁾. 방사선을 먼저 주어야 그 효과가 있음은 방사선에 대한 준치사손상의 회복에 5-FU가 억제작용한다고 보고하였다⁴⁸⁾. 그러나 다른 저자는 DNA 회복 정도는 5-FU 유무에 관계없이 비슷하여 5-FU에 의한 준치사손상의 회복에 크게 영향을 주지 않는다고 보고하였다^{26,49)}. 본 연구에서는 5-FU처리후 생존세포는 기존세포 가운데 선택적으로 살아남은 것으로 간주할 수 있으나 방사선에 의한 경우는 선택과 방사선 자체에 의한 염색체 변이 현상이 함께 있을 수 있으므로 두 처치의 표적세포의 동일성 관계는 정확히 언급하기 어렵다.

병합처리에 의한 세포독성 증가효과는 세포주기별 세포분포가 변하여 세포의 synchronization 현상이 5-FU에 의해 생길 수 있어 방사선 보다 먼저 주었을 때 S-phase 세포가 많이 줄어 방사선에 감수성이 큰 M기나 G2기에 방사선이 조사되어 상승효과를 기대할 수 있다. Vietti등 생쥐 백혈구 세포에서 시간별로 방사선조사와 5-FU를 나중에 주었기 때문에 synchronization에 의해 약물이 방사선 효과를 증가시킬 수 있다고 하였으나^{26,68)} 상대적 증식은 60시간 이내에는 일어나지 않는다고 다른 저자는 보고하였다⁶⁹⁾.

5-FU에 의한 방사선작용의 증가내지 상승효과는 5-FU의 농도가 방사선을 감작시킬 수 있을 정도가 되어야 한다. 혈중 농도가 높을수록 상승효과를 기대할 수 있고 약물처리기간도 오래될수록 상승효과가 증가되어 적어도 세포주기보다 길어야 상승효과를 기대할 수 있다. 방사선작용의 증가 혹은 상승효과는 DNA 합성뿐 아니라 RNA에 작용하여 생길 수 있다. 방사선후 DNA 합성의 억제 되어 5-FU의 DNA에 작용하는 정도가 저하되고 대신 RNA나 RNA 전

구물질에 작용하는 농도가 높아져 세포를 더 많이 죽일 수 있어 방사선에 대한 상승효과가 일어날 가능성이 있다. 5-FU가 방사선에 대한 감작작용을 하는지 방사선이 5-FU의 작용을 높이는지는 확실치 않다. 본 실험에서 48시간 이내 생존세포수의 관찰결과 상승효과 보다는 단순 증가효과를 볼 수 있었다. 5-FU에 의한 단순증가 및 상승효과는 cell line에 따라 달라서 L-cell에서 증가효과만 보고되었고⁴⁸⁾ Hela cell 및 adenoca cell에 상승효과를 볼 수 있었으며 약물 처리 스케줄 좌우되었고⁴⁹⁾ 생쥐의 공장 소낭선 세포에서는 증가효과만 볼 수 있었다⁷⁰⁾.

위 실험 A549 세포에서 5-FU와 방사선의 target이 같았고 생존세포수의 관찰로 5-FU와 방사선조사로 증가효과를 볼 수 있었으며 48시간 이후에는 증가효과가 감소됨을 볼 수 있었다. 증가효과는 세포주기의 작용부위가 방사선 및 5-FU에서 서로 다르기 때문에 생긴 것으로 추정되며 보다 큰 효과를 기대하려면 pharmacokinetics의 variation이 심하므로 좀 더 적절한 스케줄이 연구되어야겠다.

결 론

인체 폐암세포에서 유래된 A549 배양 암세포를 이용하여 개별세포의 염색체를 표지로 종양세포의 이질성을 파악한 후 화학요법제인 5-FU 처리 및 방사선조사를 단독 혹은 병용하여 항암작용의 특성을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인체 폐암세포인 A549는 11~130 개의 염색체수를 갖는 이질적인 집단이 있고 51에서 100개 사이 염색체수가 가장 많았다.

2. 방사선 및 5-FU 처리후 염색체의 분포는 2배체 이상에 선택적으로 작용하여 그 수가 줄어들었고 주로 2배체이하의 새로운 집단군이 형성되었다.

3. 방사선 및 5-FU를 병용하였을 때에도 2배체 이상의 군에 선택적으로 작용하였고 그 정도는 방사선이나 5-FU 단독 처리군보다 컸으며 2배체 이하도 단독처리군 보다 많아졌다.

4. 방사선 및 약물치료에 의한 성장억제 정도는 방사선이나 5-FU 처리후 기간이 길수록 증가되었다.

5. 방사선과 약물치료를 병용하였을 때 단독처리군보다 생존율이 감소되어 증가효과를 보였고 약물

처리 시작후 48 시간 이후는 증가효과 정도가 감소하였다.

이상과 같은 결과로 5-FU 및 방사선에 손상을 받은 표적세포의 염색체배수성의 특성은 같음을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Dexter EL, Kowalski H, Blazer BH: Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res* 38:3174-3181, 1978
2. Petersen SE, Bichel P, Lorentzen M: Flow-cytometric demonstration of tumor cell subpopulations with different DNA content in human colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 15:383-386, 1979
3. Vindelov LL, Hansen HH, Christensen IJ: Clonal heterogeneity of small cell anaplastic carcinoma of the lung demonstrated by flow-cytometric DNA analysis. *Cancer Res* 40:4295-4300, 1980
4. Von der Masse H: Interaction of radiation and 5-fluorouracil, cyclophosphamide or methotrexate in intestinal crypt cells: *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 10:77-86, 1984
5. Calabresi P, Dexter DL, Heppner GH: Clinical and pharmacological implications of cancer cell differentiation and heterogeneity. *Biochem Pharmacol* 28:1933-1941, 1979
6. Lee WY: Chromosomes of rat cell lines in vitro and in vivo in relation to tumorigenicity and response to RSV-SR. Sc.D. thesis of school of Hygiene and Public Health of the Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, 1976
7. Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:2-28, 1976
8. Shapiro JR, Young W-KA, Shapiro WR: Isolation, karyotype, and clonal growth of heterogeneous subpopulations of human malignant gliomas. *Cancer Res* 41:2349-2359, 1981
9. Horan HP, Nuti M, Colcher D, et al: Definition of antigenic heterogeneity and modulation among human carcinoma cell populations using monoclonal antibodies to tumor associated antigens. *Cancer Res* 43:3005-3009, 1981
10. Hart JR, Fidler IF: The implications of tumor cell heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis. *Biochem Biophys Acta* 651:37-50, 1981
11. Dexter DL, Lee ES, Defusco DJ: Selection of metastatic variants from heterogeneous tumor cell lines using the chicken chorioallantoic membrane and nude mouse. *Cancer Res* 43:1733-1740, 1983
12. Spremulli EN and Dexter DL: Human tumor cell heterogeneity and metastasis. *J Clin Oncol* 1:496

- 509, 1983
13. **Osborne CK:** Heterogeneity in hormone receptor status in primary and metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 12:317-326, 1985
 14. **Kerbel RS:** Implications of immunological heterogeneity of tumors. *Nature* 280:358-360, 1979
 15. **Miller BE, Miller FR, Leith J, et al:** Growth interaction in vitro between tumor subpopulations derived from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res* 40:3977, 1980
 16. **Miller BE, Miller FR, Heppner GH:** Interactions between tumor subpopulations affect their sensitivity to the antineoplastic agents cyclophosphamide and methotrexate. *Cancer Res* 41:4378-4383, 1981
 17. **Heppner GH, Ranken JR, Shapiro WR:** Tumor heterogeneity. In *pediatric Oncology* Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands, p 99-116, 1981
 18. **Tsuruo T, Fidler IJ:** Differences in drug sensitivities among tumor cells from parental tumors, selected variants, and spontaneous metastases. *Cancer Res* 41:3058-3064, 1981
 19. **Talmadge JE, Benedict K, Madsen J, et al:** The development of biological diversity and susceptibility to chemotherapy in cancer metastases. *Cancer Res* 44:3801-3805, 1984
 20. **Tubiana M:** Cell kinetics and radiation oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8:89-94, 1984
 21. **Carney DN, Mitchell JB, Kinsella TJ:** In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morphological variants. *Cancer Res* 43:2806-2911, 1983
 22. **Shilsky RL:** Tumor cell heterogeneity of malignant neoplasms: Implications for clinical practice. *Semin Oncol* 12:203-206, 1985
 23. **Johnson TS, Raju MR, Giltman RK, et al:** Ploidy and DNA distribution analysis of spontaneous dog tumors by flow cytometry. *Cancer Res* 41:3005-3009, 1981
 24. **Richard BM, Atkin NB:** DNA content of human tumors; Change in uterine tumors during radiotherapy and their response to treatment. *Br J Cancer* 13:788-800, 1959
 25. **Bagshaw MA:** Possible role of potentiators in radiation therapy. *Am J Roentgenol* 85:822-833, 1961
 26. **Berry RJ:** Effects of some metabolic inhibitors on x-ray dose response curves for the survival of mammalian cells in vitro and on early recovery between fractionated x-ray doses. *Br J Rad* 39:458-463, 1966
 27. **Moertel GC, Frytak S, Hahn RG, et al:** A randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads+5-fluorouracil) and high dose of radiation 5-fluorouracil. *Cancer* 48:1705-1710, 1981
 28. **Gastrointestinal Tumor Study Group:** A comparison of combined chemotherapy and combined modality therapy for locally advanced gastric carcinoma. *Cancer* 49:771-782, 1982
 29. **Gastrointestinal Tumor Study Group:** Prolongation of the disease free interval in surgically treated rectal carcinoma. *N Engl J Med* 312:1465-1472, 1985
 30. **Cummings BJ, Harwood AR, Keane TJ, et al:** Combined treatment of squamous cell carcinoma of the anal canal: Radical radiation therapy with 5-fluorouracil and mitomycin-C, a preliminary report. *Dis Colon Rectum* 23:389-391, 1980
 31. **Byfield FE, Barone RM, Mendelsohn J, et al:** Infusional 5-fluorouracil and x-ray therapy for non-resectable esophageal cancer. *Cancer* 45:703-708, 1980
 32. **Byfield JE, Sharp TR, Frankel SS, et al:** Phase I and II trial of 5-day infused 5-fluorouracil and radiation in advanced cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* 2:406-413, 1984
 33. **Liebner M, Smith B, Szakal A, et al:** A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17:62-70, 1976
 34. **Mealey Jr. J, Chen TT, Shupe R:** Response of cultured human glioblastoma to radiation and BCNU chemotherapy. *J Neurosurg* 4:339-349, 1974
 35. **Rothfel KH, Siminovitch L:** An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol* 33:73-77, 1962
 36. **Heidelberger C, Chandhari NK, Danenberg, et al:** Fluorinated pyrimidines; a new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 179:663-666, 1957
 37. **Ockey CH, Hsu TC, Richardson LC:** Chromosome damage induced by 5-fluoro-2-deoxyuridine in relation to the cell cycle of the Chinese hamster. *J Nat Cancer Inst* 40:456-475, 1968
 38. **Mandel HG:** Incorporation of 5-fluorouracil into RNA and its molecular consequences. *Prog Mol Subcell Biol* 1:82-135, 1969
 39. **Madoc-Johnes H, Bruce WR:** Sensitivity of L cells in exponential and stationary phase to 5-fluorouracil. *Nature* 215:302-303, 1967
 40. **Chaudhuri NK, Mukherjee KL, Heidelberger C:** Studies on fluorinated pyrimidine VII. Degenerative pathway. *Biochem Pharmacol* 1:328-341, 1959
 41. **Meyers CE, Diasio R, Elliot HM, et al:** Pharmacokinetics of the fluoropyrimidines: Implications for their use. *Ca Treat Rev* 3:175-183, 1976
 42. **MacMillan WE, Wolberg WH, Welling PG:** Pharmacokinetics of fluorouracil in humans. *Cancer Res* 38:3479-3482, 1985
 43. **Kawai M, Rosenfeld J, McCulloch P, et al:** Blood level of 5-fluorouracil during intravenous infusion.

- Br J Cancer 33:346-347, 1976
44. **Seifert P, Baker LH, Reed ML, et al:** Comparison of continuous infused 5-fluorouracil with bolus injection in treatment of patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 36:123-128, 1975
 45. **Heidelberger C, Griesbach L, Montag BJ, et al:** Studies on fluorinated pyrimidines. II. Effects on transplanted tumors. *Cancer Res* 18:305-317, 1958
 46. **Bleehan NM:** Combination therapy with drug and raditation. *Br Med Bull* 29:54-58, 1973
 47. **Vietti T, Eggerding F, Valeriotte F:** Combined effect of X-radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells. *J Nat Cancer Inst* 47: 865-870, 1971
 48. **Nakajima Y, Miyamoto T, Tanabe M, et al:** Enhancement of mammalian cell killing by 5-fluorouracil in combination with x-rays. *Cancer Res* 39:3763-3767, 1979
 49. **Byfield JE, Calabro-Jones P, Klsak L, et al:** Pharmacologic requirements for obtaining sensitization of human tumor cells in vitro to combined 5-fluorouracil or fturatat and x-ray. *Int J Radiat Oncol Bio phys* 8:1923-1933, 1982
 50. **Gollin FF, Ansfield FJ, Curreri E, et al:** Combined chemotherapy and irradiation in inoperable bronchogenic carcinoma. *Cancer* 15:1209-1217, 1962
 51. **Hall TC, Dederick MM, Chalmers TC, et al:** A clinical pharmacologic study of chemotherapy and x-ray therapy in lung cancer. *Amer J Med* 43:186-193, 1967
 52. **Sato Y, Morita M, Takahashi H, et al:** Combined surgery, radiotherapy and regional chemotherapy in carcinoma of the paranasal sinuses. *Cancer* 25: 571-579, 1970
 53. **Von der Maase H, Overgaard J:** Interaction of radiation and cancer chemotherapeutic drugs in a C3H mouse mammary carcinoma. *Acta Radiol Oncol* 24:181-187, 1985
 54. **Sinclair WK:** Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. *Rad Res* 33:620-643, 1968
 55. **Sinclair WK:** Cyclic x-ray damage in surviving chinese hamster cells. *Radiat Res* 13:556-593, 1960
 56. **Tevan A:** The significance of poliploidy for the evolution of mouse tumor strains of TA3 mammary adenocarcinoma with different ploidy. *Exp Cell Res* 11:613-629, 1956
 57. **Oksala T, Therman E:** Mitotic abnormalities and caner. In *chromosome and cancer*. John Wiley & Sone, New York, p 235-263, 1974
 58. **Kusyk CJ, Hsu TC:** Induction of high frequencies of endoreplication in mammalian cell cultures with 33258 Hoechst and rubidazone. *Cytogenet Cell Genet* 23:39-43, 1979
 59. **Schmid W:** Multipolar spindles after endoreduction. *Exp Cell Res* 42:201-204, 1966
 60. **정혜원, 김정순, 이원영 :** 방사선조사에 의한 생쥐 종양세포의 염색체 및 종양성의 변화에 관한 연구. *대한면역학회지* 4:175, 1982
 61. **심우남, 김염민, 김주덕, 이원영 :** 항암제와 세포독성에 내성을 나타내는 세포(NS-1)의 염색체 분포특성. *대한미생물학회지* 19:85-108, 1984
 62. **Tribukait B, Gustafson H, Esposti PL:** Ploidy and proliferation in human bladder tumors as measured by flow-cytofluorometric tumors as measured its relations to histopathology and cytology. *Cancer* 43:1742-1751, 1979
 63. **Look TA:** The Emerging genetics of acute lymphoblastic leukemia: Clinical and biologic implications. *Seminars Onc* 12:258-265, 1986
 64. **Hiddelman W, von Bassewitz D, Kleinemeier HJ, et al:** DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 58:258-265, 1986
 65. **Revell SH:** The breakage and reunion theory and exchange theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiations: a short history. *Advanced in Radiation Biology* 4:367-416, 1974
 66. **Evans HJ:** Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes in chromosome and cancer. John Wiley & Sons, New York, p 192-237, 1974
 67. **Carrano AV:** Chromosome aberration and radiation induced cell death. II Predictability and observed cell survival. *Mutation Res* 17:355-366, 1973
 68. **Ho E, Coffy E, Maruyama Y:** Enhancement of radiation effect on mouse intestinal crypt survival by timing of 5-fluorouracil administration. *Radiology* 125:531-532, 1977
 69. **Leshner J, Leshner S:** Effects of single-dose partial-body X-irradiation on cell proliferation in the mouse samll intestinal epithelium. *Radiat Res* 57: 148-157, 1974
 70. **Von der Masse H:** Interaction of radiation and 5-fluorouracil, cyclophosphamide or methotrexate in intestinal crpt cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10:77-86, 1984