

## 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구

서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실<sup>1</sup>, 서울대학교 암연구소센터<sup>2</sup>

고 경 환<sup>1,2,3</sup> · 하 성 환<sup>2,3</sup> · 박 찬 일<sup>1</sup>

### Relationship between Radiosensitivity and Repair Capacity in Human Epithelial Cancer Cell Lines

Kyoung Hwan Koh, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Sung Whan Ha M.D.<sup>2,3</sup> and Charn Il Park M.D.<sup>1</sup>

*Department of Therapeutic Radiology, College of Medicine, Seoul National University<sup>1</sup>,  
Cancer Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea<sup>2</sup>*

To investigate the relationship between radiosensitivity and postirradiation recovery in human cancer cells, a study was performed using human cancer cell lines-A549, CaSki, SNU-C5 and PCI-13. For the study of radiosensitivity, single doses of 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 Gy were given and for postirradiation recovery, two fractions of 4 Gy were separated with a time interval of 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, or 6 hours. Surviving fraction was estimated using colony forming ability.

Surviving fractions at 2 Gy (SF2) were 0.496 (0.570-0.412) for A549, 0.496 (0.660-0.332) for CaSki, 0.386 (0.576-0.216) for SNU-C5, and 0.185 (0.247-0.123) for PCI-13. By statistical analysis the SF2 of PCI-13 was lower significantly than those of others ( $p < 0.05$ ). This difference was also observed at 4, 6 and 8 Gy dose levels. At 6 and 8 Gy the surviving fractions of SNU-C5 were also lower significantly than A549 and CaSki ( $p < 0.05$ ). By the analysis with linear quadratic model, the values of  $\alpha$  for A549, CaSki, SNU-C5 and PCI-13 were 0.3016, 0.3212, 0.4327 and 0.8423, respectively, and those of  $\beta$  were 0.02429, 0.02009, 0.03349 and 0.00059, respectively. So, the value of  $\alpha$  showed increasing tendency with decreasing SF2. By the multitarget single hit model the values of  $D_0$  for A549, CaSki, SUN-C5 and PCI-13 were 1.97, 1.97, 1.46 and 0.81, respectively, and those of  $n$  were 1.53, 1.50, 1.56 and 2.28, respectively. So, the value of  $D_0$  decreased with decreasing SF2.

Post-irradiation recovery reached plateau at around 2 hours. Recovery ratio at plateau phase ranged from 1.2 to 4.2; the value were 1.2 for PCI-13, 3.2 for CaSki, 3.3 for SNU-C5, and 4.2 for A549. Recovery rate well correlated with SF2, and increased with increasing  $D_0$  and decreasing  $\alpha$ .

According to above results, the intrinsic radiosensitivity was quite different among the tested cell lines; PCI-13 was the most sensitive and A549 and CaSki was similar. This difference of radiosensitivity is thought to be partly due to the difference in amount of postirradiation recovery. By linear quadratic model the difference of  $\alpha$  values was very high, and by multitarget single hit model the difference of  $D_0$  value was significantly high among four cell lines.

**Key Words:** Radiosensitivity, Irradiation, Human cancer cell lines, Postirradiation recovery ratio, A549, CaSki, SNU-C5, PCI-13

\*본 논문은 1988년도 서울대학교병원 대단위 연구비의 보조에 의한 것임.

3. 현주소 : 한국 원자력연구소 부설 원자력병원 치료방사선과

## 서론

각종 암환자에서 방사선치료를 시행함에 있어 그 치료효과를 예측하기 위한 시도는 치료결과와 후향적 분석등을 통해 종양의 크기, 종양의 해부학적 위치, 병리조직학적 진단등 여러 인자들의 종합적 분석에 의한 방법들이 있으나 이와 같은 방법은 치료대상 집단의 결과 분석에 의한 것일 뿐 개개인의 치료 결과의 예측에는 거의 도움이 되고 있지 않다<sup>1,2)</sup>.

이에 따라 최근 방사선생물학적 예후인자인 클론형성세포수, 방사선감수성, proliferation kinetics 등에 대한 관심이 높아지고 있으며 특히 암세포의 방사선감수성이 주목받고 있다. 그러므로 각종 암환자에게 방사선치료를 시행하기 전에 그 치료결과를 예측하고 치료효과를 높이기 위한 방안 즉 방사선민감제, 항암제 및 수술의 병용 또는 분할조사법의 변형등 치료효과를 향상시키기 위한 시도의 필요성 여부를 결정하기 위하여는 각종 암환자의 암세포의 방사선 감수성을 미리 파악하는 것이 매우 중요하다<sup>3,4)</sup>.

Fertil과 Malaise<sup>3)</sup>는 이전에 발표된 여러 세포주의 생존곡선을 분석한 결과, 그 세포주의 방사선에 대한 감수성을 결정하는데 중요한 기준척도는 2 Gy 방사선에서의 생존율(surviving fraction at 2 Gy, 이하 SF2라 함)이지, 생존 곡선의 고선량 부위에서의 결과가 결정해 주는 인자들이 아니라고 발표하여 SF2의 중요성을 주장하고 있다.

어떤 세포의 방사선에 대한 감수성을 규명하기 위해서는 여러 다양한 방사선 조사량에 대한 세포의 집락형성능력(clonogenicity)을 측정하여, 생존 곡선을 얻는 방법이 널리 사용된다. 이 곡선을 분석하면 Do, n,  $\alpha$  및  $\beta$ 를 수학적 방법으로 계산할 수 있어, 다른 여러 세포의 그것과 수치적으로 비교해서 그 세포의 방사선 감수성의 특성을 알아낼 수 있다.

방사선감수성과 마찬가지로 방사선 조사 후의 손상으로부터의 회복 능력과 회복속도가 세포주와 조직의 종류에 따라 다르다는 것은 이미 잘 알려져 있고<sup>5)</sup> 세포나 조직이 이러한 손상으로부터 회복하는 능력과 방사선에 대한 감수성과의 관계를 알아보는 것은 매우 중요하다.

이에 저자는 중등도의 방사선감수성을 가진다고 알

려진 편평상피암과 선암들도 실제 임상에서 방사선치료시 매우 다양한 치료반응을 나타내고 있어 인체상피암세포주간의 방사선감수성의 차이를 규명하여 향후 각종암의 방사선치료시 방사선감수성 예측검사의 시행을 위한 기초자료를 위하여 본 연구를 시행하였다. 임상에서 발생빈도가 높은 암의 방사선감수성을 알기 위해 방사선치료할 때와 유사한 조건으로 A549 폐암세포주, SNU-C5 대장암 세포주, 자궁경부의 편평상피암에서 수립된 CaSki 세포주와 두경부의 편평상피암에 수립된 PCI-13 세포주에 방사선조사후의 세포 생존 분획을 2 Gy의 선량에서부터 14 Gy 까지 측정하여 방사선 생존곡선을 linear quadratic 모형과 multitarget single hit 모형에 따라 분석하여 선량에 따른 세포생존 분획과 Do, n,  $\alpha$ ,  $\beta$  등의 각종 세포생존곡선지표를 구하고 아울러 4 Gy씩 2회 분할조사하여 분할간격에 따른 방사선조사후 손상회복정도를 회복계수를 통하여 알아 보아 각종 세포생존곡선지표와 방사선손상회복계수의 상관관계를 통해 방사선감수성과 방사선 손상회복과의 관계를 규명하기 위해 본실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

본 실험에서는 4종류의 인체 암세포주를 사용하였다. SNU-C5는 분화도는 낮은 한국인 대장암 조직으로부터 수립된 선암 세포주이며<sup>6)</sup>, PCI-13는 분화도가 낮은 후구치 삼각부암 조직으로부터 수립된 편평상피암 세포주이며<sup>7)</sup>, CaSki (American Type Culture Center CRL 1550)는 자궁경부암 조직으로부터 수립된 편평상피암 세포주이며, A549 (American Type Culture Center CCL 185)는 편평상피암과 선암의 혼합형 폐암조직으로부터 수립된 세포주이다. 모든 세포주는 배양용기의 기저면에서 단층으로 증식하는 특성을 갖고 있다.

배지는 RPMI-1640 (Flow Lab. USA)에 Fetal Bovine Serum (GIBCO, USA) 5%, NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Germany) 24 mM/L, HEPES 완충액(Sigma, USA) 20 mM/L 및 gentamicin(국제약품) 50  $\mu$ g/ml 등을 첨가하여 사용하였다. 기저면의 면적이 25 cm<sup>2</sup>인 T-25 플라스크(Costar, USA)를 배양용기로 사용하였고 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C 조건에서 세포배양기(모델

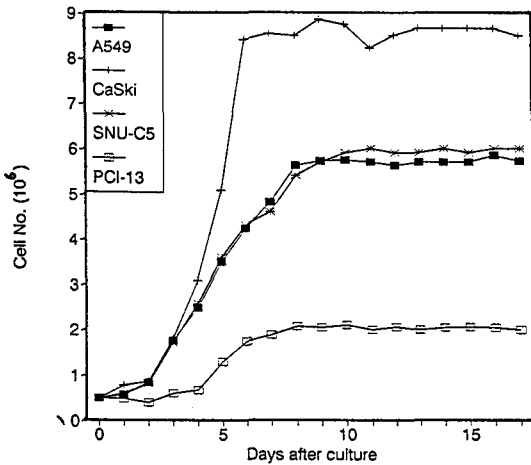


Fig. 1. Growth pattern of various human cancer cell lines. Viable cells of  $5 \times 10^5$  were plated in T-25 tissue culture flasks. The plotted points represent average readings.

8409C, 비전과학)로 배양하였다.

배지 5 ml가 든 T-25 플라스크에  $5 \times 10^5$ 개의 활성 세포를 넣고 배양을 시작한 후 새로운 배지를 전혀 첨가하지 않고 배양 하였다(unfed culture). 평형기 (plateau-phase) 세포를<sup>8)</sup> 본 실험에 사용하였으며 세포주 별로 정한 평형기의 특성은 다음과 같다.

SNU-C5 세포주는 배양 제 9일부터 제 15일까지의 기간을 평형기로 정하였으며 (Fig. 1) saturation density는  $8.4 \times 10^6$ 개였다. PCI-13 세포주는 배양 제 6일부터 제 13일까지의 기간을 평형기로 정하였으며 (Fig. 1) saturation density는  $1.9 \times 10^6$ 개였다. CaSki 세포주는 배양 제 8일부터 제 15일까지의 기간을 평형기로 정하였으며 (Fig. 1) saturation density는  $6.0 \times 10^6$ 개였다. A-549 세포주는 배양 제 8일부터 제 15일까지의 기간을 평형기로 정하였으며 (Fig. 1) saturation density는  $5.9 \times 10^6$ 개였다. 세포 수는 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 활성세포 (viable cell)만 계측하였다<sup>9,10)</sup>.

## 2. 96 Well Plate 에서의 세포수 회석

multichannel pipetter (Costar, USA)를 사용하여 96 well plate의 제 1의 8 well을 제외한 제 2열부터 제 12열까지의 88 well에 각각 새로운 배지 100  $\mu$ l를 넣고 제 1열의 8 well에 각각 상기 방법으로 계측한 일정

수의 활성세포가 포함된 배지 300  $\mu$ l 씩을 분배한 다음, 제 1열의 각 well 에서 200  $\mu$ l 씩을 뽑아 제 2열의 각 well에 미리 넣었던 배지와 균일하게 혼합한 후 동일한 과정을 반복 실시하여 제 12열까지 회석하였다.

96 well plate 에서 dilution factor는 1.5로 12회 연속 회석하였으며 동일 세포주의 동일 방사선조사군에서 사용한 96 well plate의 수는 2개로 192 well이 사용되었다. 이 때 제 1열의 well에 넣은 활성 세포의 수는 세포주의 종류 및 방사선 조사량에 따라서 상이하였으며 위의 회석 조건을 사용하기 위하여 예비실험에서 확인한 최적 조건에 따랐다.

이때 각 세포주에서의 실험결과가 각 well에 존재하는 활성세포의 수에 영향을 받음이 확인 되었으므로 이러한 차이를 줄이고, 세포집락 크기의 편차를 줄일 목적으로 활성세포의 수가 2,000개 이하인 well에 feeder 세포 1,000개 씩을 첨가하였다<sup>11,12)</sup>. feeder 세포는 각 실험군과 동일한 세포주를 사용하였으며 unfed 배양으로 평형기에 도달한 세포의 회석 직전에 50 Gy를 조사한 후 새로운 배지에  $4 \times 10^4$ /ml의 농도가 되도록 한 후 필요한 well에 각각 25  $\mu$ l씩 첨가하였다.

## 3. 방사선 조사

방사선조사는 세포가 96 well plate에 있는 상태에서 세시움-137 동물실험용 방사선 조사기 (Mark type I, Shepherd, USA)를 사용하여 실온에서 시행하였다. 방사선조사기 내에 302 attenuator를 설치하고 회전판 상부에 plate를 대칭되는 위치로 놓고 회전판을 1분에 6회 회전시키면서 방사선조사를 하여 각 plate가 균일한 방사선량을 조사 받을 수 있도록 하였다. 이러한 조건에서 ion chamber (Capintec mini 0.07 cc, CII, USA)로 측정된 선량율은 291.9 cGy/min였다.

## 4. 방사선 감수성 측정 방법

1회 방사선조사후 세포생존을 기준으로 각 세포주의 방사선감수성을 측정하였다. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 Gy의 방사선량을 조사한 실험군과 방사선을 조사하지 않은 대조군 모두 세포를 분배한 때부터 방사선을 조사한 후 plate를 세포 배양기에 넣을 때까지의 시간을 동일하게 하였고 각 세포주 별로 5내지 6개월간에 걸쳐 5 내지 6회 반복 최소 10 plate 에서 측정하였다.

5. 방사선 손상 회복량의 측정 방법

4 Gy의 방사선량을 여러 분할가격으로 2회 분할 조사하여 세포생존을 기준으로 각 세포가 받은 방사선손상이 회복된 양을 측정하였다. 분할간격은 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6시간으로 하였으며 분할조사사이의 시간에 각 plate는 배양기에 보관하였다. 각 세포주 별로 5내지 6개월간에 걸쳐 5내지 6회 반복 최소 10 plate에서 측정하였다.

6. 세포 생존의 측정과 생존 분획 산출

세포집락 형성 능력을 기준으로 세포생존을 판단하였다. 이러한 세포집락 형성능력의 측정은 다음과 같은 방법 및 기준을 사용하였다.

96 well plate내 세포를 12~14일간 배양시킨 후 상층의 배지를 제거한 후 plate 전체를 0.5% crystal

violet (Sigma)-20% ethanol (Merck) 혼합액에 넣어 3분간 염색한 후 점적수로 여분의 혼합액을 제거하였다. 실온에서 24시간 동안 건조시킨 후 형성된 세포집락을 위상차 현미경 (Biostar, American Optical, USA)을 이용하여 육안적으로 관찰하여 50개 이상의 세포로 이루어진 세포 집락을 방사선조사후 생존한 세포가 증식한 세포집락으로 판정하고 이를 기준으로 각 well에서 세포집락의 형성여부를 계측하였다. 형성된 세포집락의 형태는 경계가 명료한 원형 또는 타원형이었으며 세포수가 적은 well에서는 서로 분리되었으나 세포수가 많은 well에서는 서로 융합된 양상이 관찰되었다. 실험결과의 대표적인 예는 Fig. 2와 같았다.

방사선조사를 하지 않은 plate를 각 실험군의 대조군으로 설정하여 대조군에서 얻은 clonogenic fraction (이하 'c'로 표기함)를 기준으로 하여 그 실험군의 생존분획 (surviving fraction ; 이하 'SF'로 표기함)을 산출하였다.

$$SF = \frac{\text{실험군의 clonogenic fraction}}{\text{대조군의 clonogenic fraction}}$$

clonogenic fraction은 Ha 등의 방법에 따라 산출하였다. 즉

$$C \times a = -\ln(1 - Pa)$$

이때 c = clonogenic fraction

a = well에 배양시킨 세포수

Pa = 배양한 세포수가 a 개인 well 중에서 세포집락이 1개 이상 관찰된 well의 비율

따라서 특정 조건에서의 clonogenic fraction은  $-\ln(1 - Pa)$ 를 절편 없이 a에 선형회귀시켜 얻었다<sup>13)</sup>.

7. 세포 생존 모델에 의한 분석 및 손상 회복량 측정

방사선 조사량 D (Gy)와 방사선 조사후 포유류 세포의 생존 분획 (SF) 간의 관계를 분석하는데 유용한 2가지의 세포생존곡선모델에 따라 1회 방사선 조사후 얻은 자료를 비선형회귀시켜 각 지표를 얻었다.

우선 linear quadratic 모델의 수식인

$$\log_e SF = -(\alpha D + \beta D^2)$$

$\alpha$  (linear inactivation coefficient: Gy<sup>-1</sup>)와  $\beta$

(quadratic inactivation coefficient: Gy<sup>-2</sup>)를 구하였고

다음 multitarget single hit 모델의 수식인

$$SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n$$

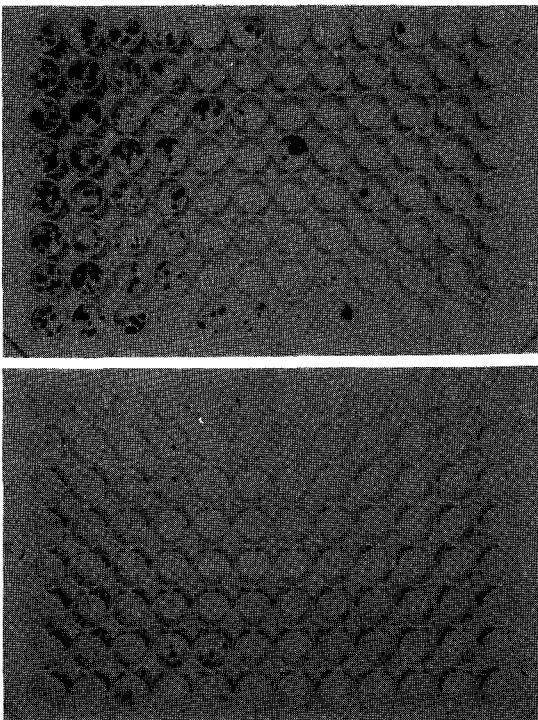


Fig. 2. Photograph of colonies of cancer cells stained with 0.5% crystal violet-20% ethanol mixture solution after 14 days of subculture in 96 well plate. Cells in upper 96 well plate were recieved 4 Gy  $\gamma$ -irradiation and cells in lower 96 well plate were recieved 8 Gy  $\gamma$ -irradiation.

Table 1. Surviving Fraction ( $\pm$ SD) of Plateau-phase Human Cancer Cell Lines

Dose (Gy)	Cell lines			
	A549	CaSki	SNU-C5	PCI-13
2	.496 $\pm$ .042	.496 $\pm$ .082	.386 $\pm$ .095	.185 $\pm$ .031
4	.208 $\pm$ .023	.178 $\pm$ .008	.102 $\pm$ .026	.0158 $\pm$ .0022
6	.0563 $\pm$ .0056	.0815 $\pm$ .0079	.0214 $\pm$ .0055	.00483 $\pm$ .00209
8	.0327 $\pm$ .0096	.0413 $\pm$ .0084	.00443 $\pm$ .00107	.000245 $\pm$ .000182
10	.00774 $\pm$ .00274	.00642 $\pm$ .00209	.000526 $\pm$ .000177	—
12	.00123 $\pm$ .00028	.000672 $\pm$ .000303	.00005 $\pm$ .000035	—
14	.00022 $\pm$ .00014	—	—	—

\*A549: lung cancer cell line CaSki: uterine cervix cancer cell line SNU-C5: colon cancer cell line PCI-13: retromolar trigone cancer cell line

$D_0$  (mean lethal dose: Gy)와  $n$  (target number)를 구하였다.

분할조사후 얻은 세포생존분획과 분할 간격이 0시간인 실험에서의 생존 분획의 비율인 회복비(recovery ratio: 이하 'RR' 이라함)를 다음의 수식에 따라 산출하고 이를 방사선손상이 회복된 양으로 평가하였다.

즉

$$RR = \frac{SF_{(i=T)}}{SF_{(i=0)}}$$

단,  $SF_{(i=0)}$  = 분할 조사 간격이 0 시간인 실험군의 생존분획

$SF_{(i=T)}$  = 분할 조사 간격이 T 시간인 실험군의 생존분획

세포의 내재적 방사선감수성과 세포생존곡선의 여러 지표 및 방사선조사후 손상회복의 관계를 규명하기 위하여 각 인체암세포주의 SF 2,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $D_0$ ,  $n$ , 그리고 RR 간의 관계를 통계적으로 분석하였다.

## 성 적

### 1. 방사선감수성 양상

방사선에 대한 선량반응 중 2 Gy에서의 세포생존 분획(SF2)은 A549가 0.496 (0.570-0.412), CaSki가

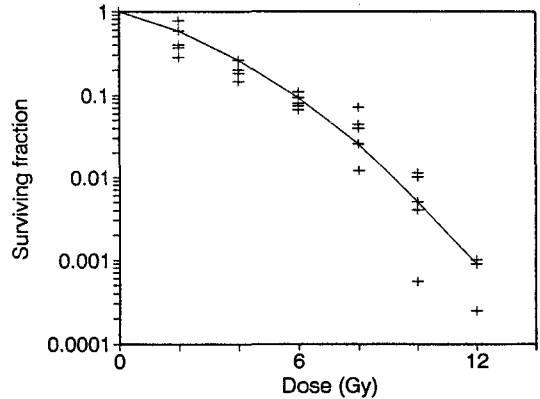


Fig. 3. Cell survival curve of A549 human cancer cell lines to  $\gamma$ -irradiation. Each dot plotting represents observed value and the curve was fitted according to linear quadratic model.

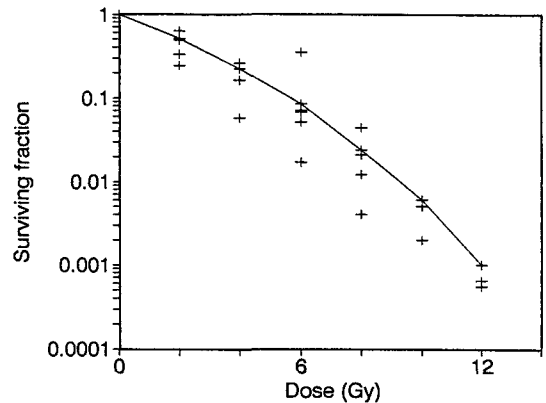


Fig. 4. Cell survival curve of CaSki human cancer cell lines to  $\gamma$ -irradiation. Each dot plotting represents observed value and the curve was fitted according to linear quadratic model.

0.496 (0.660-0.332), SNU-C5 가 0.386 (0.576-0.216), PCI-13 에서 0.185 (0.247-0.123)로 PCI-13이 다른 세가지 인체상피암세포주에 비해 통계학적으로 유의하게 작은 SF2를 보였고( $p < 0.05$ ) 이와 같은 차이는 선량이 4, 6, 8 Gy로 증가할 때도 같은 순서를 보였고 6 Gy와 Gy 에서는 SNU-C5도 A549, CaSik에 비해 통계학적으로 유의하게 작은 세포생존분획을 보였다( $p < 0.05$ ) (Table 1). 세포생존분획을 선량에 따라 반대수그래프로 나타내면 Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 및 Fig. 7에서 보는 것과 같이 선량이 증가함에 따라 생존분획이 감소하며 초기의 저선량 부위에서는 곡선

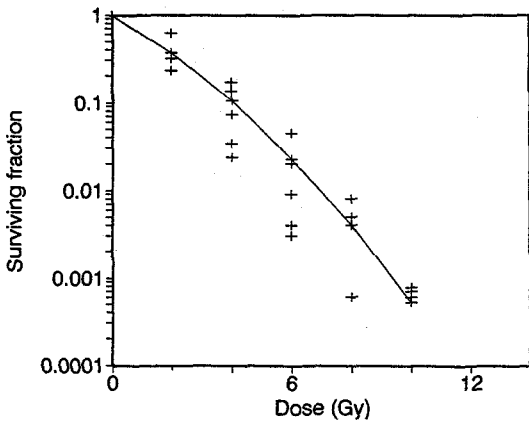


Fig. 5. Cell survival curve of SNU-C5 human cancer cell lines to  $\gamma$ -irradiation. Each dot plotting represents observed value and the curve was fitted according to linear quadratic model.

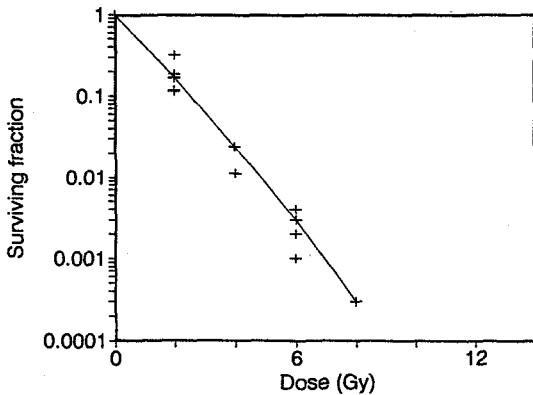


Fig. 6. Cell survival curve of PCI-13 human cancer cell lines to  $\gamma$ -irradiation. Each dot plotting represents observed value and the curve was fitted according to linear quadratic model.

형을 보이고 고선량에서는 직선에 가까운 양상을 나타내었다. A549와 CaSki의 경우에는 초기의 저선량부위에서 뚜렷한 곡선형을 보이고 고선량부위에서는 직선에 가까운 양상을 보였고 그 기울기도 유사했으며 SNU-C5는 초기 곡선 부분은 뚜렷하나 직선부위의 기울기가 보다 더 급격하였으며 PCI-13의 경우 초기 곡선부위가 뚜렷하지 않았으나 직선부위의 기울기는 가장 급격하였다.

Linear quadratic 모형으로 분석한 방사선세포생존 곡선의 분석결과는 A549, CaSki, SNU-C5, PCI-13에서  $\alpha$ 는 각각 0.3016, 0.3212, 0.4327 및 0.8423 이었고

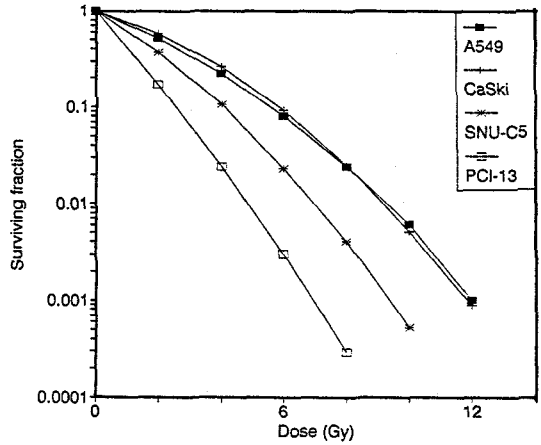


Fig. 7. Cell survival curves of 4 human epithelial cancer cell lines to  $\gamma$ -irradiation.

Table 2. Parameters of Cell Survival Curves of Plateau-phase Human Cancer Cell Lines

Parameters	Cell lines			
	A-549	CaSki	SNU-C5	PCI-13
$\alpha$ (Gy <sup>-1</sup> )	.3016 ± .0372	.3212 ± .0718	.4328 ± .1046	.8423 ± .3875
$\beta$ (Gy <sup>-2</sup> )	.02429 ± .01079	.02009 ± .00206	.03349 ± .03731	.00059 ± .00226
Do (Gy)	1.972 ± .218	1.975 ± .417	1.467 ± .370	0.8142 ± .5121
n	1.531 ± 0.266	1.502 ± .503	1.558 ± .701	2.286 ± 3.718

\*A549: lung cancer cell line CaSki: uterine cervix cancer cell line SNU-C5: colon cancer cell line PCI-13: retromolar trigone cancer cell line  $\alpha$ : linear inactivation coefficient  $\beta$ : quadratic inactivation coefficient Do: mean lethal dose n: target number

$\beta$ 는 각각 0.02429, 0.02009, 0.03349 및 0.00059로 나타났다. Multitarget single hit 모형으로 분석한 결과는 A549, CaSki, SNU-C5, PCI-13에서 Do가 각각 1.97, 1.97, 1.46 및 0.81 이었고 n이 1.53, 1.50, 1.56 및 2.28을 보여 SNU-C5와 PCI-13의 Do 값이 A549와 CaSki에 비해 현저히 낮았으며 Do 값은 PCI-13이 가장 낮았다(Table 2).

방사선 생존곡선의 제지표인 linear quadratic 모형의  $\alpha$ ,  $\beta$  및 multitarget single hit 모형의 Do, n과 SF2와의 상관관계를 본 결과 SF2와 linear quadratic 모형의  $\alpha$  값의 상관관계가 높았으며(regression equation:  $\alpha = -1.70 \times SF2 + 1.14$ ,  $r^2 = 0.9816$ ) multi-target sin-

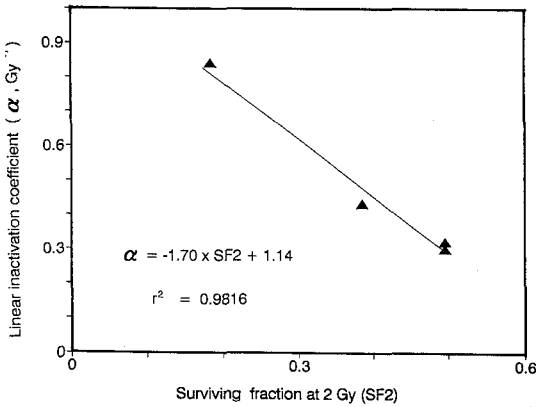


Fig. 8. Correlation between  $\alpha$  and SF2 of 4 human cancer cell lines.

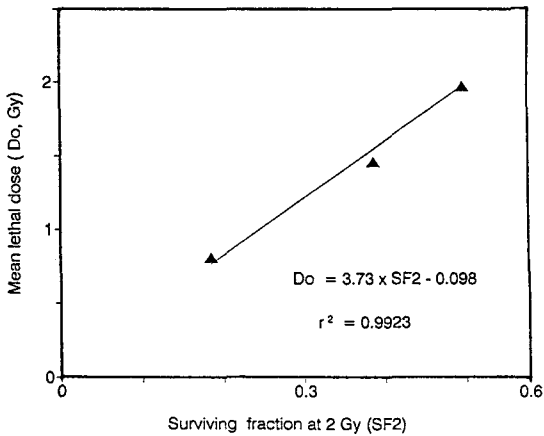


Fig. 9. Correlation between Do and SF2 of 4 human cancer cell lines.

gle hit 모형의 Do 값과 SF2도 밀접한 상관관계를 보였다 (regression equation:  $Do = 3.73 \times SF2 + 0.09$ ,  $r^2 = 0.9923$ ) (Fig. 8, Fig. 9).

## 2. 방사선조사후 손상회복량의 양상

분할조사에 의한 방사선손상회복정도는 2시간 내에 포화상태에 도달하였으며 포화상태의 RR은 1.25에서 4.25의 범위였고 PCI-13이 1.2, CaSki가 3.2, SNU-C5가 3.3 그리고 A549는 4.25였다 (Fig. 10).

네가지 상피암세포주의 내재적방사선감수성은 동일 조직형인 PCI-13과 CaSki에서도 현저한 차이를 보였다. 이와 같은 감수성의 차이와 손상회복정도의 연관성을 보기위해 SF2와 RR과의 관계를 선형회귀 시켜본 결과 높은 상관관계를 보였다 (regression equation:

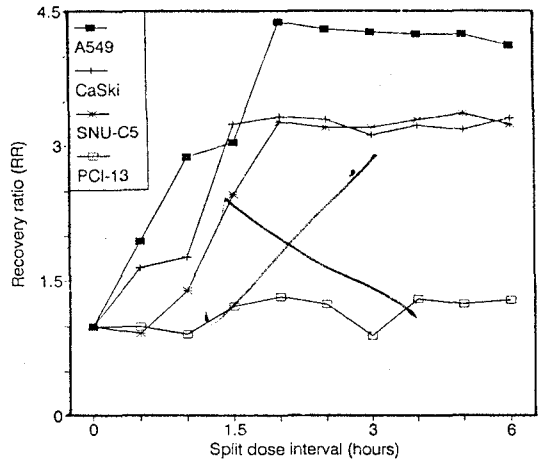


Fig. 10. Recovery ratio changes of 4 human cancer cell lines according to the interval with split dose  $\gamma$ -irradiation.

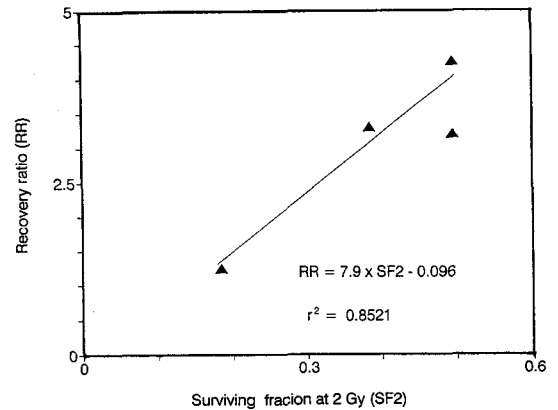


Fig. 11. Correlation between SF2 and RR of 4 human cancer cell lines.

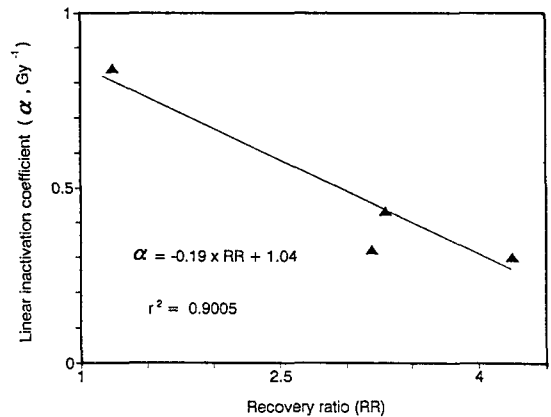


Fig. 12. Correlation between  $\alpha$  and RR of 4 human cancer cell lines.

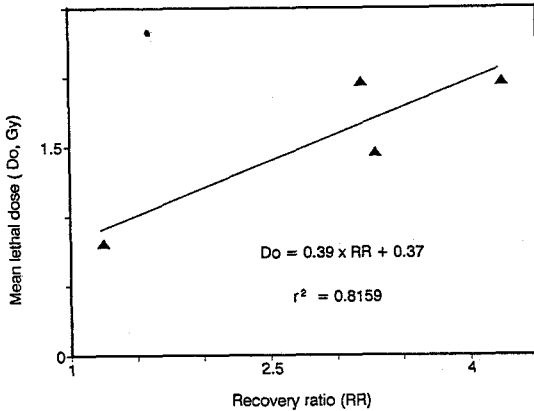


Fig. 13. Correlation between  $D_0$  and RR of 4 human cancer cell lines.

$RR = 7.92 \times SF_2 - 0.096$ ,  $r^2 = 0.8521$ ) (Fig. 11). 방사선 생존곡선의 제지표인 linear quadratic 모형의  $\alpha$ ,  $\beta$  multitarget single hit 모형의  $D_0$ ,  $n$ 과 RR 과의 상관관계를 본 결과 RR과 linear quadratic 모형의  $\alpha$  값의 상관관계가 높았고 (regression equation:  $\alpha = -0.19 \times RR + 1.04$ ,  $r^2 = 0.9005$ ) multitarget single hit 모형의  $D_0$  값과 RR도 밀접한 상관관계를 보였다 (regression equation:  $D_0 = 0.39 \times RR - 0.37$ ,  $r^2 = 0.8156$ ) (Fig. 12, Fig. 13).

### 고 찰

본 연구의 결과 중등도의 방사선감수성을 갖는 상피암종 편평상피암과 선암에서 수립된 4가지 암세포주의 방사선감수성이 SF2를 기준으로 PCI-13이 A549나 CaSki 보다 현저히 높았고 SF4나 SF6 등을 기준으로 SNU-C5가 높게 나온 것은 인체 암세포가 환자에 따라 매우 다양한 방사선감수성을 가지고 있음을 분명하게 보여주는 증거가 된다.

방사선으로 각종 암을 완치시키는 데는 종양크기, 암이 시작된 조직이나 기관, 암세포의 분화정도 그리고 종양의 증식속도등 많은 인자가 관여한다<sup>14,15</sup>). 각종 암에 대한 종양치사선량의 범위는 많은 임상치료 결과들 토대로 하거나 또는 부분적인 방사선 생물학적 기전의 파악으로 대부분 시행되고 있으며 실제 치료에서 사용되는 방사선량과 분할조사방법은 종양의 병리조직학적 소견과 종양주위조직의 해부학적 위치에 따라 크게 결

정된다. 그러나 이와 같은 종양치사선량의 결정은 대부분 편평상피암 또는 선암의 경우에 준용되고 있으나 악성임파종과 같이 방사선감수성이 매우 높거나 악성흑색종처럼 방사선감수성이 낮은 경우 적정치사선량의 결정이 매우 어렵다<sup>3</sup>).

2 Gy 내외의 작은 방사선량에 대한 암세포의 방사선반응은 실제 임상에서 쓰이는 분할조사량이 2 Gy 내외이므로 매우 중요하고 이와 같은 방사선량에서의 방사선효과는 개개인의 인체암이 가지고 있는 클론형성 세포들 고유의 방사선감수성에 의하여 결정되므로 방사선치료의 결과 예측에 있어 방사선세포생존곡선의 초기 저선량부분의 분석이 매우 중요하다<sup>3</sup>). 이와 같은 초기 저선량부분의 분석 즉 SF 1.5 또는 SF2를 기준으로 방사선감수성과 방사선치료효과를 연관시켜 Deacon 등은 신경아세포종, 임파종을 그룹 A로 ( $SF_2 = 0.15$ ) 소세포폐암, 기형종, 교종성수아세포종을 그룹 B로 ( $SF_2 = 0.27$ ) 유방암, 자궁암을 그룹 C로 체장암, 대장직장암, 폐암을 그룹 D로 악성흑색종, 골육종, 신장암을 그룹 E로 ( $SF_2 = 0.49$ ) 구분하였고<sup>16</sup>), Malaise 등은 방사선감수성을 상 중 하로 분류하여 감수성이 높은 암종류로 임파종, 소세포폐암, 교종성수아세포종, 골수종, 난소암 및 신아세포종을 들고 이 경우 평균 SF 1.5가 0.35라고 보고했고 중등도의 방사선감수성을 갖는 암종류로는 편평상피암, 대장암, 비소세포성폐암, 방광암, 유방암 및 체장암을 들고 이 경우 SF 1.5는 0.51이었으며 악성흑색종, 다형성교아종, 골육종 및 신암이 SF 1.5가 0.55로 가장 낮은 방사선감수성을 보인다고 보고하였다<sup>17</sup>). 그러나 이와 같은 분류는 암세포주의 방사선반응도의 결과를 기존의 임상결과와 관련시켜 본 시도일 뿐 개개 암세포주의 방사선감수성의 다양성을 포함하지 못하고 있다. Brock등<sup>18</sup>)은 방사선치료 전 치료결과 예측을 위한 방사선감수성검사의 방법으로 두경부 편평상피암 환자에서 방사선치료 시행전 생검조직으로부터 일차배양한 세포에서 SF2를 측정후 후 측정된 SF2와 치료결과와의 상관관계를 연구한 결과 편평상피암의 SF2는 0.11에서 0.91까지의 범위로, 변이의 차이가 매우 크고 평균 0.33이라고 보고한 바 본 연구에서 얻어진 0.185에서 0.496의 SF2 범위는 이들의 보고와 잘 일치하고 있음을 보여주고 있으며 이들의 경우 두경부 편평상피암이 기타부위의 편평상피암보다 약간 높은 경향을 보여준다는 보고도 본 연구의 결과



후구치삼각부에서 생긴 편평상피암에서 수립된 PCI-13이 자궁경부암에서 수립된 CaSki 세포주보다 방사선 감수성이 높게 나온 결과와 일치한다. 일부에서는 SF2 등 방사선 세포생존곡선의 초기 저선량 부위의 분석에 따라 방사선반응도가 예측가능하고 두경부의 편평상피암에서 SF2가 0.4 이상인 경우에는 0.3 이하인 경우보다 재발의 위험도가 높다고 보고하고 있으나<sup>4)</sup> 환자의 전신상태, 종양의 크기 및 종양의 위치에 대한 고려가 간과되었으므로 좀 더 복합적인 연구를 필요로 한다.

배양 세포를 이용한 *in vitro* 연구는 세포수준에서의 생물학적 현상 규명에 유용할 뿐 아니라 그 연구 결과는 생체내 *in vivo* 조직에 제한적으로 적용할 수 있다. Hahn<sup>8)</sup>이 평형기 세포는 80% 이상이 증식하고 있지 않으나 증식 잠재력이 있는 G<sub>0</sub> 세포로 구성되어 있으며 배양 용기의 기저면에 부착하여 자라는 세포주에서 나타난 평형기에서는 전체 세포수의 변화가 없이 기저면에서 탈락하여 배지에 부유하는 세포와 기저면에 부착하여 있으면서 증식하고 있는 세포 및 증식하지 않는 세포 간의 역동적 평형상태에 있음을 밝혀진 이후 평형기에 있는 세포들이 *in vivo* 종양 조직의 좋은 모델이고 아울러 지수적 증식기에 있는 세포들이 정상조직의 좋은 모델로 알려졌다<sup>17~19)</sup>. 또한 *in vivo* 종양은 초기에는 종양내 세포수가 지수적으로 증가하나 세포수가 증가함에 따라 활발히 증식하는 세포의 분획은 점차 감소하여 세포수의 증가는 점차 완만해지는 Gompertzian 증식을 하는 것으로 밝혀져 있어, 증식 과정의 관점에서 세포 배양시의 세포증식 양상(Fig. 1 참조)과 유사하다. 또한 unfed 평형기에서의 배지 pH는 종양 조직의 pH가 평균 6.96(6.6-7.4)이라는 보고에도 부합된다. 따라서 본 연구에서 설정한 unfed 배양시의 평형기 세포는 영양소는 결핍되었으나 산소 분압은 낮지 않은 종양 조직의 좋은 모델로 생각된다.

내재적 방사선감수성이 다양한 원인중의 일부로 세포배양방법의 차이에 의한 영향으로도 보고<sup>20)</sup>하기도 하나 방사선 조사를 agar에서 시행하거나 단층배양에서 시행하거나 큰 차이가 없다는 보고도 있다<sup>21)</sup>. 물론 실험 방법에 따라 얻어진 내재적 방사선 감수성이 큰 차이를 보일 수 있겠으나 본 연구에서처럼 같은 실험실에서 동일조건 동일방법으로 측정된 내재적 방사선감수성이 차이를 보이는 것은 기술적인 문제외에도 많은 다른 인자들이 관여됨을 증명해 주는 것이다<sup>22)</sup>. 내재적

방사선 감수성을 비교하는 방법으로 SF2 방법을 이용하는 것은 현재 임상 방사선치료에 사용되는 분할조사량과 방사선생물학적 측면에서의 배성선량의 측정지표가 모두 1.8~2.0 Gy인 이유가 가장 크지만 그보다는 이와 같은 실험방법에 따라 얻은 방사선 생존곡선의 고선량부위만을 가지고 상호비교하기에는 많은 문제점이 있기 때문이다<sup>3)</sup>. 인체 암세포주의 내재적 방사선 감수성은 암세포의 병리조직학적 종류에서 기인하는 것으로 생각하고 내재적 방사선 감수성을 상중하로 대별하려는 노력도 있었으며 그 차이가 통계학적으로 유의하다는 보고도 있다<sup>1)</sup>. 그러나 이와 같은 분류를 시행함에 있어서도 다양한 SF2를 보일 수 있으며<sup>14)</sup> 본 연구의 결과도 중등도 방사선감수성을 가진다는 병리조직학적 분류에 속하는 인체상피암세포주 임에도 불구하고 측정된 SF2 값은 넓은 범위로 분포되어 방사선에 대한 감수성이 매우 다양함으로 방사선 치료전 방사선감수성을 예측할 수 있는 검사의 필요성이 매우 강조된다. 그리고 실제 임상에서 사용하고 있는 2 Gy의 다분할조사 방법에 의한 생체내종양 세포의 반응정도는 동일종양에서 얻은 배양된 세포주가 시험관 내에서 2 Gy의 단일 조사에 대해 반응하는 것과 잘 일치하고 근치목적의 치료에서는 30회이상의 분할 조사가 시행되므로 2 Gy 조사후 반응정도의 미세한 차이도 치료결과에는 엄청난 차이를 보일 수 있기 때문에 방사선 감수성이 방사선 치료에 대한 임상적 반응 정도를 결정하는 중요한 인자다.

중등도 방사선 감수성을 보이는 세포들이 방사선 조사 후 1.5~2.5 시간 배양하면 Potentially lethal damage to X-irradiation(이하 X-PLD로 약함)의 50%를 회복하며 4~6시간 배양하면 X-PLD의 대부분이 회복되는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 본 연구의 결과 분할조사에 의한 방사선손상회복은 2시간 내외에 포화상태에 도달하였으며 포화상태의 RR은 1.2에서 4.2의 범위였고 PCI-13이 1.2, CaSki가 3.2, SNU-C5가 3.3 그리고 A549는 4.2로서 회복속도 및 회복량 면에서 타 연구결과<sup>13,41)</sup>와 일치하였다.

Ataxia telangiectasia 환자의 경우처럼 방사선에 의한 손상 후 전혀 회복이 이루어지지 않기 때문에 방사선에 대한 감수성이 높다는 보고<sup>23)</sup>가 있고 본 연구의 결과에서도 RR과 SF2와 상관관계가 높아 방사선감수성에 손상회복이 크게 기여함을 보여주었다. linear

quadratic model에 따르면 방사선 손상회복정도는  $\beta$ 에 비례하고 분할조사량의 제곱에 비례하는데 2 Gy 내의 방사선 조사에서의 내재적 방사선 감수성을 나타내는 SF2에는  $\alpha$ 의 영향이 더 크기 때문에 회복정도가 큰 경우와 거의 없는 경우 모두에서 방사선 감수성이 높을 수 있다. 그러나 손상회복이 높아서 감수성이 낮아지는 경우가 적지 않다면 손상회복억제방법에 의해 방사선 감수성을 변화시킬 수 있을 것이다.

## 결 론

방사선감수성의 차이와 방사선조사후 방사선손상회복정도를 평형기 인체암세포주 A549, CaSki, SNU-C5 및 PCI-13에서 연구하여 다음과 같은 결론에 도달했다.

1) 방사선에 대한 선량반응 중 2 Gy에서의 세포생존분획(SF2)이 A549에서 0.496, CaSki에서 0.496, SNU-C5에서 0.386, PCI-13에서 0.185로 나타났다.

2) 2 Gy에서의 세포생존분획(SF2)는 linear quadratic 모형의  $\alpha$  값과 multitarget single hit 모형의  $D_0$  값과 밀접한 상관관계를 보였다.

3) 방사선손상회복은 2시간 내외에 포화상태에 도달하였으며 포화 상태의 RR은 1.2에서 4.2의 범위였고 PCI-13이 1.2 CaSki가 3.2 Snu-C5가 3.3 그리고 A549는 4.2였다.

4) 2 Gy에서의 세포생존분획(SF2)는 방사선손상회복능력(RR)과 높은 상관관계를 보였다.

5) 방사선손상회복능력(RR)은 linear quadratic 모형의  $\alpha$  값과 multitarget single hit 모형의  $D_0$  값과 밀접한 상관관계를 보였다.

즉 동일 병리조직학적 분류에 속하는 세포주 사이에서도 방사선감수성이 현격한 차이를 나타내었으며 이러한 방사선감수성의 차이는 방사선손상회복과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

따라서 암환자 방사선치료시 개인별 방사선감수성을 방사선치료전에 파악함으로써 치료선량의 적정화 및 치료방법의 선택을 용이하게 하고 또한 암세포의 손상회복능력을 선택적으로 억제함으로써 치료효과를 높일 수 있을 것으로 예상된다.

## REFERENCES

1. Peters LJ: Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response. *Radiother Oncol* 17:177, 1990
2. Horwich A: The future of radiotherapy. *Radiother Oncol* 19:353, 1990
3. Fertil B, Malaise EP: Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7:621, 1981
4. Brock WA, Baker FL, Wike JL, et al: Cellular radiosensitivity of primary head and neck squamous cell carcinomas and local tumor control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18:1283, 1990
5. Thames HD: Effect independent measures of tissue responses to fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol* 45:1, 1984
6. Park JG, Oie HK, Sugarbaker PH, et al: Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 47:6710, 1987
7. Heo DS, Snyderman C, Gollin SM, et al: Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res* 49:5167, 1989
8. Hahn GM, Stewart JR, Yang SJ, et al: Chinese hamster cell monolayer cultures I. changes in cell dynamics and modifications of the cell cycle with the period for growth. *Exp Cell Res* 49:285, 1968
9. Freshney RI: Culture of animal cells. a manual of basic technique. 2nd ed, New York, Alan R Liss Inc, 1987 pp 227
10. Patterson Jr MK: Measurement of growth and viability of cells in cultures. *Methods Enzymol* 58: 141, 1979
11. Revesz L: Effect of lethally damaged tumour cells upon the development of admixed viable cells. *J Nat Cancer Inst* 20:1157, 1958
12. Puck TT, Marcus PL, Cieciura SJ: Clonal growth of mammalian cells in vitro growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "feeder" layer. *J Exp Med* 103:273, 1956
13. Ha SW, Suit HD: A study on radiation tumor control of microscopic tumors of the C3Hf/Sed mouse spontaneous fibrosarcoma. *J Korean Soc Ther Radiol* 6:151, 1988
14. Duncan W, Nias AHW: Clinical radiobiology. Edin-

- burgh, Churchill Livingstone 1977
15. **Hall EJ:** Radiobiology for Radiologists. 3rd ed, Philadelphia, J.B. Lippincott 1988 pp 293-330
  16. **Deacon J, Peckham MJ, Steel GG:** The radiation responsiveness of human tumors and the initial slope of the cell-survival curve. *Radiother Oncol* 2: 317, 1984
  17. **Harris JR, Murthy AK, Belli JA:** Repair following combined X-ray and heat at 41°C in plateau phase mammalian cells. *Cancer Res* 37:3374, 1977
  18. **Mauro F, Falpo B, Briganti G, et al:** Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells I. description of the plateau-phase system. *J Nat Cancer Inst* 52:705, 1974
  19. **Watanabe I, Okada S:** Stationary phase of cultured mammalian cells (L5178Y). *Int J Radiat Biol* 35: 285, 1967
  20. **Good M, Lavin M, Chen P, et al:** Dependence on cloning method of survival of human melanoma cells after ultraviolet and ionizing radiation. *Cancer Res* 38:4671, 1978
  21. **Smith IA, Coutrenay VD, Mills J, et al:** In vitro radiation response of cells from four human tumors propagated in immune-suppressed mice. *Cancer Res* 38:390, 1978
  22. **Fertil B, Deschavanne PJ, Lachet B, et al:** In vitro radiosensitivity of six human cell lines. A comparative study with different statistical models. *Radiat Res* 82:297, 1980
  23. **Weischelbaum RR, Nive J, Little JB:** Deficient recovery from potentially lethal radiation damage in ataxia telangiectasia and xeroderma pigmentosum. *Nature* 271:261, 1978
-