

Ginkgo Biloba Extract가 C3H 마우스 섬유육종의 저산소세포 분획에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실¹⁾ 및 암연구소²⁾, 원자력병원³⁾

조철구^{2, 3)} · 이춘자²⁾ · 하성환^{1, 2)} · 박찬일¹⁾

= Abstract =

The Effect of Ginkgo Biloba Extract on Hypoxic Fraction of C3H Mouse Fibrosarcoma

Chul Koo Cho, M.D.^{2, 3)}, Chun Ja Yi, B.S.²⁾, Sung Whan Ha, M.D.^{1, 2)}
and Charn Il Park, M.D.¹⁾

*Department of Therapeutic Radiology¹⁾, Laboratory of Radiation Biology, Cancer Research Institute²⁾,
Seoul National University College of Medicine, Korea Cancer Center Hospital³⁾, Seoul, Korea*

Purpose : To investigate the effect of Ginkgo biloba extract (GBE) on hypoxic cell fraction and metabolic status in fibrosarcoma (FSa II) of C3H mouse.

Materials and Methods : Fibrosarcoma (FSa II), 6 mm in diameter, growing in the right hindleg muscle of C3H mouse was used for estimation of hypoxic cell fraction using comparison of TCD₅₀. Radiation was given one hour after administration of GBE (100 mg/Kg, i.p.) with or without priming dose of GBE (100 mg/Kg, i.p.) given 24 hours earlier. Radiation was also given under air breathing condition or clamp hypoxia without GBE as controls. ³¹P NMR spectroscopy was performed before and one hour after administration of GBE with or without priming dose of GBE.

Results : TCD_{50/120's} were 81.7 (77.7-86.0) Gy when irradiated under clamped hypoxia, 69.6 (66.8-72.5) Gy under air breathing condition, 67.5 (64.1-71.1) Gy with a single dose of GBE (100 mg/kg) given one hour before irradiation, and 62.2 (59.1-65.5) Gy with two doses of GBE given at 25 hours and one hour before irradiation. The hypoxic cell fractions, estimated from TCD_{50/120's}, were 10.6% under air breathing condition, 7.2% after a single dose of GBE, and 2.7% after two doses of GBE. The results of ³¹P NMR spectroscopy were as follows. PCr/Pi ratio was 0.27 ± 0.04 and 0.40 ± 0.04 before and one hour after a single dose of GBE (p<0.05), respectively, without priming dose and 0.30 ± 0.02 and 0.71 ± 0.04, respectively, with priming dose (p<0.01). These findings indicate that the metabolic status is slightly improved after a single dose and markedly after repeated administrations.

Conclusion : GBE decreases the hypoxic cell fraction and improves the meta-

* 본 논문은 암연구소센터연구비 (KOSEF-SRC-56-CRC-93-14) 및 신경인더스트리 연구비의 지원에 의한 것임

abolic status of tumor, probably by increasing the blood flow and delivery of oxygen and nutrients, resulting in increased radiosensitivity of tumor.

Key Words : GBE, C3H mouse fibrosarcoma, TCD₅₀, Hypoxic cell fraction, ³¹P NMR spectroscopy, PCr/Pi

서 론

악성종양은 크기가 점차 커져서 혈류공급이 충분치 못하게 되면, 세포에 대한 영양분 및 산소 공급이 부족하게 되어 종양내에 저산소 세포가 생기게 되며, 이 세포는 방사선, 특히 저 LET 방사선에 대하여, 산소 공급이 충분한 세포에 비해 방사선 감수성이 2.5 내지 3 배의 1로 낮고, 따라서 방사선 치료 후 살아남을 가능성이 높아, 방사선 치료 실패의 주요 원인이 된다. 실험동물과 인체의 악성종양에서는 저산소세포의 비율이 10 내지 15% 정도인 것으로 알려져 있는데^{1,2)}, 이러한 저산소세포에 대한 방사선 치료의 효율을 높이기 위하여 고압산소요법 (hyperbaric oxygen therapy), 고 LET 방사선 치료법, 온열치료법, 저산소세포 방사선 민감제 (hypoxic cell radiosensitizer), 약제를 이용하여 종양세포의 산소공급을 늘이는 방법 등 많은 실험적 및 임상적 연구들이 시행되어 왔으나, 아직 이에 대한 적절한 방법이 개발되어 있지 못한 실정이다³⁾.

Ginkgo biloba extract (GBE)는 약 500 년 동안 중국에서 기관지 천식 및 기관지염 치료에 사용되어 왔으며, 서구사회에서는 혈류장애 및 뇌부전증에 탁월한 효과를 갖고 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 또한, GBE의 약리작용에 대한 연구도 많이 진행되어 이의 작용기전이 비교적 소상히 밝혀져 있다⁴⁻⁸⁾.

GBE가 방사선 치료와 병용 사용시 종양에 미치는 효과는 현재까지 보고된 바가 없으나 본 연구와 동시에 시행된 C3H 마우스의 섬유육종 (fibrosarcoma, FSa II)을 모델로 한 실험에서 GBE 단독 투여만으로는 종양성장에 미치는 영향이 없었으며, 방사선과 병용 투여시, 방사선 단독으로 조사한 군에 비해 현저한 종양성장지연 효과를 얻을 수 있었는데⁹⁾, 이러한 현상은 GBE에 의하여 종양내 혈류량이 증가되어 종양의 산소 및 영양분 공급이 증가됨으로써 종양의 방사선 감수성이 증가되는 것으로 추측된다.

따라서, C3H 마우스의 섬유육종 (fibrosarcoma, FSa II)을 이용하여 GBE 투여에 따른 종양치유방사선량을 구하고, 이로부터 GBE에 의한 저산소분획의 변화를 확인하며 또한 ³¹P 핵자기공명 분광법을 이용

하여 종양내 대사상태의 변화를 측정함으로써 GBE에 의한 종양세포의 방사선 감수성 증가의 기전 일부를 밝히고자 본 실험을 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 종양

실험동물, 종양모델 및 종양이식의 자세한 내용은 이미 보고한 바 있으므로^{10,11)}, 간단히 요약하면, 미국 보스턴 (Boston) 소재 Massachusetts General Hospital의 치료방사선과내 Edwin L. Steel Laboratory에서 분양받아 서울대학교 의과대학 암연구소내 방사선생물학 연구실의 무균동물실에서 defined flora colony 상태로 번식 사용되고 있는 C3H 마우스와 C3H 마우스에서 자연발생되어 동종이식을 통해 유지되고 있는 섬유육종 (fibrosarcoma, FSa II)을 사용하였다.

2. 종양이식

단일종양세포현탁액 (single cell suspension)을 필요한 세포 농도로 희석한 후, 1,000 개의 암세포와 치사선량의 방사선 (120 Gy in vitro)을 받은 2×10^5 개의 feeder cell을 혼합하여 미세주사기 (microsyringe, Hamilton, USA)로 마우스의 우측하지 근육에 이식하였다. 이때 접종물의 양은 5 μ l가 되도록 하였다. 이식 후 10 일이 경과하여 직경이 6 mm에 도달하였을 때 실험을 시행하였다.

3. 실험군 설정

저산소세포분획을 산출하기 위한 방사선에 의한 종양국소치유 실험에는 결찰에 의한 저산소상태에서 방사선만을 조사한 군, 산소공급이 충분한 공기 중에서 방사선만 조사한 군, GBE 100 mg/kg를 1 시간 전에 1 회 투여 후 방사선을 조사한 군, GBE 100 mg/kg를 24 시간 간격으로 2 회 투여 후 방사선을 조사한 군으로 나누어 실험을 시행하였다. 각 군별로 방사선량을 달리하여 6 내지 7 개의 소군으로 구분하였으며 각 소군별로 10 마리 전후의 마우스를 사용하였다.

^{31}P 핵자기공명 분광분석법을 위한 실험군은 4 종류로 나누어 시행하였는데, 각 군에는 각각 3 마리를 배정하였다. 대조군은 GBE 를 투여하지 않은 군 (Control), 제 1 군은 GBE 를 1 회 투여하고 1 시간 후에 검사를 시행한 군 (GBE-1), 제 2 군은 GBE 를 24 시간 전에 1 회 투여하고 검사를 시행한 군 (GBE-24), 제 3 군은 24 시간 간격으로 2 회 투여후 1 시간 경과시 검사를 시행한 군이다 (GBE-25).

모든 실험은 종양의 직경이 6 mm 에 도달하였을 때 시행하였으며, 모든 마우스의 오른쪽 귀에 고유번호가 새겨진 클립을 표식문으로 하여 붙인 다음 구분하였고, 각 군별로 암수 동수로 하여 해당 실험동물을 무작위로 추출하여 배정하였으며, 처치 후에도 실험군과 관계없이 무작위로 cage 에 넣어 관찰하였다.

4. GBE 의 투여

실험에 사용된 GBE 는 주식회사 선경 인더스트리로부터 제공받았다. GBE 는 증류수에 희석한 후 마우스의 체중 킬로그램 (kg) 당 100 mg 을 방사선 조사 1 시간 전에 1 회 또는 25 시간 및 1 시간 전에 복강내로 2 회 주사하였다. GBE 는 마우스에서 복강내 투여시 45 내지 90 분에 최대효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 방사선 분할 조사의 경우 GBE 의 반복 투여가 필요하므로 방사선 조사 1 일 전에 priming dose 를 주고 다시 1 시간 전에 재차 투여하였다.

5. 방사선 조사

서울대학교 의과대학 암연구소에 설치된 실험동물 방사선 조사기인 Cs-137 irradiator (Mark type II, Shepherd, USA) 를 사용하였다. 방사선 조사는 3×3 cm 크기로 종양부위에만 국소적으로 시행하였으며, 조사시 실내온도는 24°C 전후였다. 선량률은 분당 458 cGy 였다. 마우스는 마취없이 고정가능한 알루미늄판에 고정하여 무균상태를 유지하도록 밀폐된 알루미늄 상자에 넣어¹¹⁾ 방사선을 조사하였다. 인위적으로 저산소상태를 유발하기 위하여 마우스 체중 kg 당 50 mg 의 pentobarbital (중의제약, Korea) 로 마취한 다음, 방사선 조사 3 분 전에 종양근위부 대퇴 중간부위를 결찰하였다. 저산소군 이외의 실험군에서는 마취없이 방사선을 조사하였다. 방사선 조사중 무균 상태의 공기 호흡을 위하여 공기 압축기에 공기 여과기를 달아 알루미늄 상자내에 무균 상태의 공기를 주입하였다.

6. 결과분석

종양치유방사선량(TCD_{50/120})의 산출 : 방사선 조사 후 120 일까지 1 주 2 회 관찰하여 종양이 완전히 관해되고, 종양 이식 부위에 재발한 소견이 없는 경우를 종양의 국소 치유로 간주하였다. 각 실험군에서 방사선량별로 종양치유율을 구하고, 각 실험군에 속한 마우스의 50% 에서 종양을 국소치유시키는데 필요한 방사선량을 logit analysis 에 의하여 산출하였다¹²⁾.

저산소분획의 산출 : 저산소분획을 산출하는 방법은 clamped tumor control dose assay 법을 이용하여 계산하였다^{1, 13)}. 이 계산방법의 최종공식은 다음과 같다.

$$\text{저산소세포분획} = e^{[\text{TCD}_{50}(\text{test}) - \text{TCD}_{50}(\text{clamp hypoxia})] / \text{Do.h}}$$

여기서, Do.h = mean lethal dose in hypoxia;
5.4 Gy for FSa II 이다.

7. ^{31}P 핵자기공명 분광검사법(^{31}P Magnetic Resonance Spectroscopy)

C3H 마우스의 우측 발등에 FSa II 종양을 이식하여 종양의 크기가 6 mm 에 도달하였을 때 본 검사를 시행하였다.

핵자기공명기기는 아산생명과학연구소 NMR 연구실에 설치된 4.7 T/30 cm Biospec MRS/MRI system (Bruker, Switzerland) 을 사용하였는데, 검사방법은 박 등¹⁴⁾ 의 방법을 수정하여 시행하였다.

Solenoid 는 절연체에 싸인 은선 (silver wire) 으로서 내경이 1.0 cm 되게 두 바퀴를 감아 만들었고, 수소 원자와 인원자의 공명주파수가 각각 200.215 MHz 와 81.037 MHz 에서 임피던스 50Ω 에 이중정합 (double tuning) 이 되도록 조정된 회로에 연결하였다. 준비된 마우스를 직경 30 cm, 4.7 Tesla MRS 기기 내에 넣고 분광기 (spectrometer) 에 연결하였다. 장균질도 (static field homogeneity) 는 수소 원자공명 (water proton resonance) 에서 보정하여 조절하였다. ^{31}P 획득 조건수 (acquisition parameters) 는 분광폭 5000 Hz, 블럭크기 8 K (digital resolution 1.2 Hz/point), 펄스간격 2.2 seconds, 펄스폭 40 μs, 획득수 (acquisition) 1024, 전체 평균시간은 약 38 분/스펙트럼 으로 시행하였다. 핵자기 공명 스펙트럼으로부터 PCr/Pi 비, PCr/(Pi + PME) 비, PME/ATP 비 및 Pi/ATP 비를 구하였다.

결 과

1. 종양치유방사선량 (TCD₅₀)

결찰에 의한 저산소상태에서 방사선을 조사한 경우의 종양치유방사선량은 81.7 (77.7-86.0) Gy 이었고, 산소공급이 충분한 공기 중에서 방사선을 조사한 경우는 69.6 (66.8-72.5) Gy 이었다. GBE 100 mg/kg 를 방사선 조사 1 시간 전에 1 회 투여한 군에서는 종양치유방사선량이 67.5 (64.1-71.1) Gy 로서 대조군 (공기 중에서 방사선만을 조사한 군) 에 비하여 다소 감소하였으며, GBE 를 2 회 투여한 경우에는 62.2 (59.1-65.5) Gy 로 현저히 감소하였다 (Table 1). 특히, GBE 를 2 회 투여한 경우에는 종양치유방사선량이 대조군의 그것과 95% 신뢰구간이 전혀 중첩되지 않으므로 GBE 2 회 투여에 따른 종양치유방사선량의 감소 효과는 통계학적으로 유의하였다.

2. 저산소세포분획의 변화

위에서 얻은 종양치유방사선량으로부터 산출한 저

산소세포분획은 대조군의 경우에는 10.6% 로 기존에 발표된 것과 비슷한 범위에 있었으며, GBE 를 1 회 투여한 경우는 7.2% 로 다소 감소하였고, 2 회 투여한 경우에는 2.7% 로 현저히 감소하였다 (Table 1).

3. ³¹P 핵자기공명 분광분석법

GBE 를 투여하고 측정된 ³¹P 핵자기공명스펙트럼의 변화를 보면, 측정하기 1 시간 전에 GBE 를 투여했을 때, 무기성 인산염 (Pi) 의 peak 는 대조군보다 감소하였으나, GBE 를 24 시간 전에 투여한 군에서는 대조군의 peak 와 비슷하였다. GBE 를 측정하기 전 24 시간 간격으로 2 회 투여한 경우, 무기성 인산염의 peak 는 현저히 감소하였다. PCr 과 ATP 의 peak 는 측정하기 1 시간 전에 GBE 를 투여한 경우 대조군보다 다소 증가하였으나, 24 시간 전에 투여했을 때에는 대조군과 비슷하였다. GBE 를 2 회 투여하고 측정된 경우에는 이들의 peak 가 대조군 및 1 회 투여한 군보다 현저히 높아졌다 (Fig. 1). 따라서, GBE 투여에 따라, 특히 2 회 투여시 종양내 대사상태가 호전되었음을 알 수 있었다.

종양내 대사상태를 반영하는 인자인 PCr/Pi 비는 대조군에서는 0.27 ± 0.04, GBE 를 측정 1 시간 전에 투여한 경우에는 0.40 ± 0.04 로 대조군에 비해 1.5 배 증가하였고 (p<0.05), GBE 를 측정 24 시간 전에 투여한 경우에는 0.30 ± 0.02 로서 대조군과 비슷하였다 (p>0.5). 그러나, GBE 를 24 시간 간격으로 2 회 반복 투여한 경우에는 0.71 ± 0.04 로 대조군보다 2.6 배 정도 현저히 증가하였고 (p<0.01), 측정 1 시간 전에 투여한 경우에 비해서도 약 1.8 배 증가하였다 (p<0.05)(Fig. 2).

PCr/(Pi+ PME) 비는 대조군에서는 0.12 ± 0.01, GBE 를 측정 1 시간 전에 투여한 경우에는 0.18 ± 0.01 로 대조군에 비해 약간 증가하였고 (p>0.05), GBE 를 측정 24 시간 전에 투여한 경우에는 0.13 ± 0.01 로서 대조군과 비슷하였다 (p>0.05). 그러나,

Table 1. TCD₅₀ Values and Estimated Hypoxic Fractions

Group	TCD50(95% CI)*	Hypoxic fraction(%)
Radiation under clamp hypoxia	81.7(77.7-86.0)	(100)
Radiation under air	69.6(66.8-72.5)	10.6
GBE 100 mg/kg** + Radiation	67.5(64.1-71.1)	7.2
2×GBE 100m g/kg*** + Radiation	62.2(59.1-65.5)	2.7

* CI: confidence interval

** Single dose of Ginkgo biloba extract (100 mg/kg), injected i.p. one hour before irradiation

*** Two doses of Ginkgo biloba extract (100 mg/kg), injected i.p. 25 hours and one hour before irradiation

Table 2. Effect of GBE on Metabolic Parameters Measured by ³¹P MRS in Mice with FSa II

Group	Pcr/Pi	PME/ATP	Pi/ATP	PCr/(Pi+ PME)
Control	0.27 ± 0.04*	1.25 ± 0.12	1.26 ± 0.35	0.12 ± 0.01
GBE-1	0.40 ± 0.04	1.08 ± 0.06	0.92 ± 0.16	0.18 ± 0.01
GBE-24	0.30 ± 0.02	1.38 ± 0.11	1.06 ± 0.06	0.13 ± 0.01
GBE-25	0.71 ± 0.04	0.99 ± 0.11	0.51 ± 0.02	0.25 ± 0.02

* Mean ± standard error

GBE-1 ; Administration of GBE, one hour before measurement

GBE-24; Administration of GBE, 24 hrs before measurement

GBE-25; Two times administration of GBE. 25 hrs and one hour before measurement

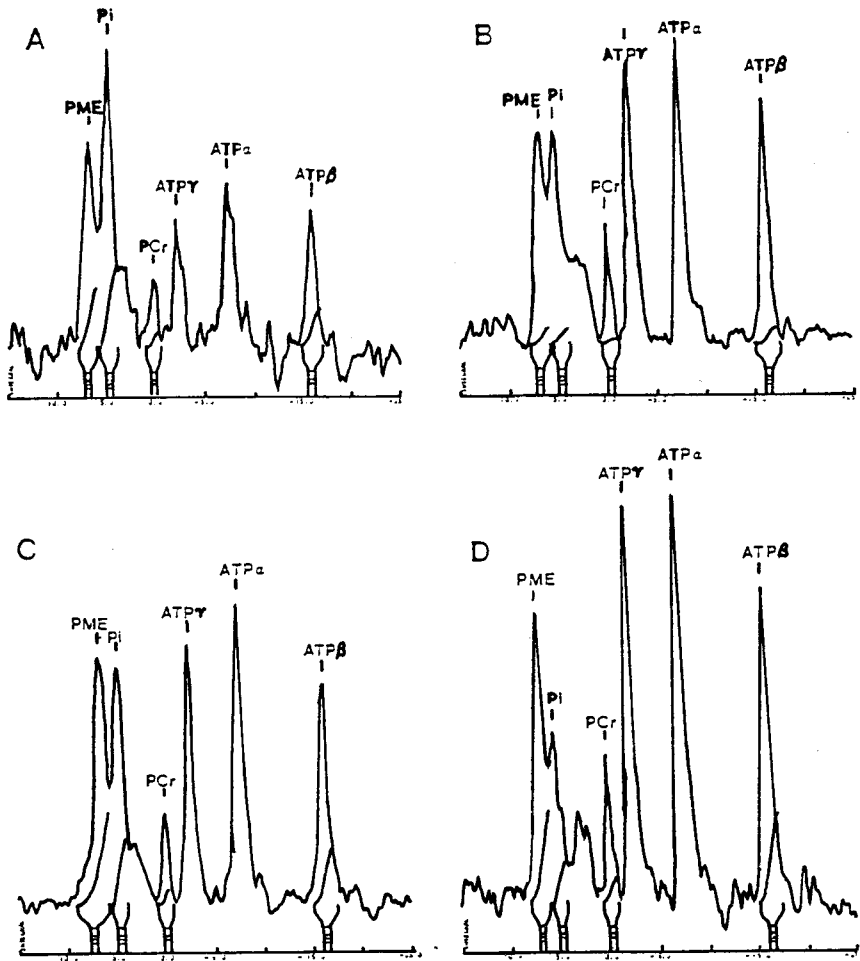


Fig. 1. In vivo ³¹P NMR spectra of C3H mouse fibrosarcoma after Ginkgo biloba extract (GBE) administration. (A) Control without GBE administration; (B) GBE administration one hour before measurement; (C) GBE administration 24 hours before measurement; (D) GBE administration twice 25 hours and one hour before measurement.

GBE 를 24 시간 간격으로 2 회 반복 투여한 경우에는 0.25 ± 0.02 로 대조군보다 2 배 정도 증가하였다 ($p < 0.01$).

PME/ATP 비는 대조군에서는 1.25 ± 0.12 , GBE 를 측정 1 시간 전에 투여한 경우에는 1.08 ± 0.06 ($p > 0.05$), GBE 를 측정 24 시간 전에 투여한 경우에는 1.38 ± 0.11 로 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 그러나, GBE 를 24 시간 간격으로 2 회 투여한 경우에는 0.99 ± 0.11 로 대조군에 비해 21% 정도 감소하였다 ($p < 0.05$).

Pi/ATP 비는 대조군에서는 1.26 ± 0.35 , GBE 를

측정 1 시간 전에 투여한 경우에는 0.92 ± 0.16 ($p > 0.05$), GBE 를 측정 24 시간 전에 투여한 경우에는 1.06 ± 0.06 이었으나 ($p > 0.05$), GBE 를 24 시간 간격으로 2 회 반복 투여한 경우에는 0.51 ± 0.02 로 대조군에 비해 40%로 정도 감소하여 ($p < 0.01$) PME/ATP 비와 비슷한 양상을 보였다 (Table 2).

이상의 결과에서 측정 1 시간 전의 GBE 투여에 의하여 종양내 대사상태가 다소 호전되었으며, 측정 24 시간 전 투여시는 대조군과 유사한 상태였으며, 24 시간 간격의 2 회 반복 투여시는 현저히 호전됨을 알 수 있었다.

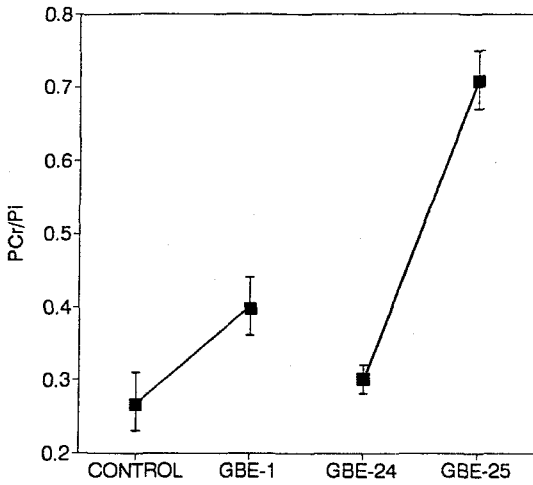


Fig. 2. Change of PCR/Pi ratio by Ginkgo biloba extract (GBE) administration. Vertical bars indicate one standard error. Control means the group without GBE administration; GBE-1, GBE administration one hour before measurement; GBE-24, GBE administration 24 hours before measurement; GBE-25, GBE administration twice 25 hours and one hour before measurement.

고 찰

종양내에 저산소세포가 존재한다는 사실은 주로 동물종양을 대상으로 한 실험에서 증명되었으나^{15, 16)}, 인체종양에서도 존재한다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다. 종양은 성장함에 따라 종양내에 비정상적인 혈관구조의 생성으로 효과적인 산소 공급을 어렵게 하며³⁾, 종양내 pH가 낮아져 적혈구의 변형성이 감소하여¹⁷⁾ 혈류의 속도가 느려져¹⁸⁾ 적절한 시기에 산소 공급이 이루어지지 않아 저산소세포가 생기게 된다. 이러한 종양내 저산소상태의 존재는 세포의 생존 자체를 위협하지 않으면서 방사선에 대한 감수성을 낮게 하므로 저산소세포의 방사선에 대한 저항성을 극복하기 위한 방법이 필요하다. 종양내 저산소세포의 존재가 방사선 치료실패의 주요 원인이라고 알려진 이래, 이를 극복하여 방사선 치료 성적을 높이려는 시도가 계속되어 왔으며, 지금도 보다 효과적인 방법을 개발하기 위한 노력이 꾸준히 계속되고 있다. 방사선과 병용치료시 종양내 저산소세포만을 선택적으로 공격하는 방법에는 여러가지가 있으나, 크게 대별하여 보면, (1) 고압산소요법 (hyperbaric oxygen therapy), (2) 저산소세포민감제 (hypoxic cell radiosensitizers), (3) 종양내 혈류

량을 증가시켜 산소공급을 충분히 해 주는 화학조절제 (chemical modifiers), (4) 온열요법, (5) 고 LET 방사선 치료법 등이 있다. 그러나, 이러한 방법들은 실제 시행시 여러가지 번거러움과 약제 사용시에 따른 부작용으로 인하여 현재 널리 사용되지 못하고 있다^{19, 20)}.

종양내 존재하는 저산소세포에 혈류증가를 통해 산소공급을 증가시킴으로써 방사선 감수성을 높이려는 시도는 적어도 30년 전부터 있어 왔다. 일반적으로 종양내 혈관들은 혈관작용성 자극 (vasoactive stimuli)에 대해 반응을 나타내지 않으므로²¹⁾, 혈관긴장도를 변화시켜 혈류량을 증가시키는 말초혈관확장제의 사용으로 종양내 혈류량을 증가시키지 못한다. 특히 종양내 혈관조직은 혈관벽에 평활근을 갖고 있지 않으므로, 평활근을 이완시켜 혈류량을 증가시키는 칼슘 길항제의 사용으로도 종양내 혈류량을 효과적으로 증가시키기는 어렵다. 일부 학자들에 의해 위의 약제 사용으로 종양내 혈류량을 증가시킬 수 있다고 보고하였으나¹⁷⁾, 이는 종양내 혈관벽에 직접 작용하여 혈관긴장도를 이완시켜 혈류량을 증가시키기 보다는 주위 다른 조직에서의 변화에 의한 이차적인 결과 ("steal effect")에 의한 것이거나, 혹은 낮은 pH에서 일반적으로 경직되어 있는 적혈구의 변형도의 증가에 기인하는 것으로 생각된다¹⁷⁾. 고혈압 치료제에 사용되는 말초혈관확장제인 hydralazine의 경우에는 오히려 종양내 혈류량을 정상치의 10 내지 30%로 낮추어 종양내 저산소분획을 최고 100%까지 증가시키기 때문에 종양세포의 방사선에 대한 감수성의 증대를 기대하기 어려우며¹⁵⁾, 이러한 사실은 최근에 박 등에 의해서도 증명되었다²²⁾. 최근에 인위적 산소 운반체인 perfluorocarbon emulsion이 산소운반을 용이하게 하여 종양내 저산소세포분획을 감소시켜 방사선에 대한 감수성을 증가시킨다고 보고되어 이에 대한 많은 관심이 집중되고 있으나^{23, 24)}, 종양의 종류에 따라 순환 장애와 산소화의 양상이 매우 상이하고 또한 종양의 산소화 및 이의 조절기능에 대하여 완전히 밝혀져 있지 않기 때문에 몇몇 특수한 종양 모델에서 나타난 perfluorocarbon emulsion의 효과를 다른 많은 종양에서도 비슷하게 나타날 것으로 예측하는 것은 아직 시기상조이다. 현재까지 진행된 이 약제를 사용한 임상시험의 결과, 약 자체의 부작용으로 생각되는 비장증대와 부종으로 인하여 반복투여가 어려워, 부작용을 줄인 보다 효과적인 약제의 개발이 강구된다.

본 실험에서 사용한 Ginkgo biloba extract는 이미 수 세기 전부터 중국에서 기관지 천식과 기관지염 치료에 사용되어 왔으며, 독일과 프랑스를 비롯한 서구

사회에서도 말초혈류장애 및 뇌기능부전증 환자에서 사용되어 좋은 임상 결과를 얻었으며²⁵⁾, 장기간 사용 시에도 부작용이 거의 없고 이의 약리작용 기전이 비교적 잘 알려져 있어 안전하게 임상에 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

GBE의 약리학적 작용 기전은 크게 4 가지로 나누어서 생각할 수 있다. 첫째는, 동맥, 정맥 및 모세혈관의 혈관조절작용을 통하여 혈류량을 증가시킨다. 60명의 환자에 GBE 200 mg 을 4 일동안 연속적으로 투여했을 때, 혈액의 피부관류가 증가하고, 혈액의 점도와 적혈구의 탄력성이 감소했으며, 손톱주름 (nail fold) 모세혈관의 혈류량이 증가하고 적혈구의 응집이 감소함을 관찰하였다⁴⁾. 둘째는, 혈소판 활성화인에 대한 길항작용을 갖고 있어, 혈소판의 응집을 막아주고, 호중구 (neutrophil) 의 탈과립화과 산소 라디칼의 생성을 막아준다⁵⁾. 따라서, 뇌경색증에 빠져 있는 동물에 투여했을 때, 대뇌의 대사작용이 개선되고, 저산소화에 의한 대뇌 장애를 막아준다는 사실을 알게 되었다⁴⁾. 셋째는, 뇌신경세포의 대사작용을 항진시키고, 뇌신경전달물질의 장애를 개선시킨다. 넷째는, 자유 라디칼에 의한 세포막의 손상을 막아주는 자유 라디칼 청소작용을 갖고 있다. Superoxide 음이온을 제거하여 내피세포성 이완인자의 반감기를 늘려줌으로써, 수축된 혈관의 이완을 촉진시킨다⁴⁾.

GBE의 중앙혈류에 미치는 영향에 대하여는 아직 보고된 바가 없으나, 본 실험과 동시에 시행된 동일 모델을 이용한 실험에서 GBE가 방사선에 의한 중앙성장지연효과를 크게 증가시킨다는 사실이 확인되었다⁹⁾. 이러한 방사선에 대한 감수성의 증가 원인을 규명하기 위해 GBE에 의한 중앙치유방사선량의 변화를 관찰하고 이로부터 중앙내 저산소세포분획의 변화를 산출하였다. GBE 100 mg/kg 를 2 회 투여하고 방사선을 조사한 경우 가장 많은 중앙치유방사선량의 감소가 관찰되었으며, TCD₅₀ 결과로부터 계산한 저산소세포분획은 충분한 산소상태에서 방사선을 조사한 경우의 10.6%에 비해 GBE를 2 회 투여하고 방사선을 조사한 경우에서 2.7%로 현저한 감소를 보였다. 본 실험에서는 중앙내 혈류량을 직접 측정하지 않았으나, GBE의 약리작용으로 미루어 보아 중앙내 혈류량의 증가에 의해 저산소세포분획이 감소한 것으로 생각된다.

중앙내 저산소세포분획을 측정하는 방법에는 암조직내 저산소세포의 비율 감소를 증명하는 방법과 암조직내 산소분압을 직접 측정하는 방법이 있다^{26, 27)}. 암조직내 산소분압을 직접 측정하는 방법은 중앙내 산소

분압의 증가를 직접 증명할 수 있다는 장점이 있으나, 측정절차가 매우 복잡하고 산소분압의 증가만으로는 방사선 치료시 GBE의 영향 유무 및 그 정도를 규명하기에는 미흡하다. 게다가, 저산소세포는 괴사상태에 있는 세포와 달리 집락형성능력 (clonogenicity)를 갖고 있기 때문에 중앙내 산소분압을 직접 측정했다고 해서 저산소세포의 집락형성능력을 반영했다고 볼 수가 없다. 이에 비하여 전자는 방사선 치료효과를 이용한 측정 방법이므로 방사선 치료 측면 또는 방사선 생물학적 측면에서의 산소분압 증가 및 이에 따른 저산소세포분획의 감소를 정량적으로 증명할 수 있어, 저산소세포의 집락형성능력의 변화를 효과적으로 반영한다고 볼 수 있다. 또한, 이러한 저산소세포분획의 감소 원인을 규명하기 위한 중앙내 혈류량의 증가에 의한 산소 및 영양분 농도의 증가를 직접 측정하는 방법은 측정하는데 많은 시간을 필요로 하며, 측정방법이 복잡하여 실험자 및 실험방법에 따라 그 결과에 많은 차이를 보이고 있으며, 또한 그 방법이 침습적이기 때문에 인체에 직접 적용하는 데에는 많은 어려움이 뒤따른다. 이러한 점에서, 비록 측정방법이 간접적이기는 하지만, 비침습적이고 인체에 직접 적용할 수 있으며, 인체세포의 대부분을 구성하고 있는 ¹H, ¹³C 및 ³¹P 분자의 spin 배열의 변화를 이용하여 세포내 구성성분의 변화 및 대사상태의 변화를 측정함으로써 사용코자 하는 어떤 치료제 혹은 치료방법의 효율성을 검색할 수 있는 핵자기공명 분광분석법이 각광을 받게 되었다.

1981년 Griffiths 등이 Walker 256 carcinosarcoma를 대상으로 한 실험에서 처음으로 ³¹P 핵자기공명 분광분석법을 이용하여 중앙내의 대사상태를 측정할 때, 이 방법이 비침습적이며, 또한 치료 효과의 분석에 있어서 중앙의 대사상태의 변화가 치료 효과를 잘 반영해 주는 것으로 생각되어 이에 대한 관심이 고조되어 있다. 본 실험에서도 GBE 투여에 의한 중앙세포의 대사상태의 호전을 증명하여 향후 GBE의 임상적용시 이용하고자 하였다.

일반적으로 중앙의 크기가 증가하면, 중앙의 에너지 상태는 저하되어, ATP와 PCr의 농도는 감소하고, 무기성 인산염과 AMP, ADP 및 PME는 증가하여, PCr/Pi 비와 ATP/Pi 비는 감소하게 되는데^{28, 29)}, PCr/Pi 비의 감소에 의해 나타나는 중앙의 에너지 상태의 저하는 이 중앙내에 저산소세포분획의 증가를 의미하는 것이며, 중앙의 크기가 100 mm³에서 500 mm³으로 커지면 저산소세포분획이 약 12%에서 66%까지 증가한다고 보고되었다²⁸⁾. 본 실험에서는

GBE 를 투여함에 따라, 종양내 저산소세포분획이 대조군의 10.6% 에서 GBE 를 2 회 투여시 2.7% 까지 감소하였으며, 이때 ^{31}P 핵자기공명 분광분석법에 의한 PCR/Pi 비는 0.27 ± 0.04 에서 0.71 ± 0.04 로 증가하였고, PCR/(Pi+PME) 비는 0.12 ± 0.01 에서 0.25 ± 0.02 로 증가하였으며, PME/ATP 비는 1.25 ± 0.12 에서 0.99 ± 0.11 로 감소하여, GBE 투여에 의한 종양내 대사상태의 호전을 증명할 수 있었다. 이러한 종양내 대사상태의 호전은 방사선에 대한 종양세포의 감수성의 증가와도 잘 일치하였다.

현재까지 GBE 를 이용하여 종양내 혈류량을 증가 시킴으로써 저산소분획을 감소시켜 저산소세포의 방사선에 대한 감수성을 증가시키려는 시도는 없었다. 따라서, 본 실험은 이에 대한 최초의 것이라고 생각되어진다. 본 실험에서는 GBE 투여에 따른 종양치유방사선량의 감소를 관찰하고, 여기에서 종양내 저산소세포분획을 산출하여 방사선에 대한 감수성이 증가함을 확인하였으며, ^{31}P 핵자기공명 분광분석법을 이용하여 종양내 대사상태의 호전을 관찰하여 저산소세포분획의 감소 기전을 규명하였다. 위에서 언급한 GBE 의 약리 작용에서 보는 바와 같이 GBE 는 다른 말초혈관확장제와는 달리, 직접 혈관벽에 작용하여 혈관을 이완시키기 보다는 적혈구의 변형성을 증가시켜 점도를 감소 시킴으로써 혈류량을 증가시키기 때문에 종양내 혈관조직의 특성에 잘 부합되어 실제 임상시도에서도 좋은 결과를 얻을 것으로 기대되며, 방사선과 병용치료시 첨가효과 내지 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 방사선효과 증강제로 사용하기 위해서는 종양조직에 대한 효과가 정상조직에 대한 효과보다 더 커야 한다는 것이 필수적이다. 본 실험실에서 시행한 GBE 투여가 마우스 피부 및 공장소낭선의 방사선 감수성에 미치는 영향에 관한 실험에서 종양조직에서와는 달리, 정상조직에 별다른 영향을 끼치지 않는다는 사실에서³⁰⁾ 항 후 임상적용시 치료효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

이상과 같은 본 연구 결과 GBE 의 투여로 저산소세포분획의 감소를 관찰하였고, 비록 직접적으로 혈류량의 증가를 측정하지 않았으나, ^{31}P 핵자기공명 분광분석법을 이용하여 종양내 대사상태의 호전을 관찰함으로써 이에 의한 종양세포의 방사선에 대한 감수성의 증가를 마우스의 fibrosarcoma 를 모델로 하여 확인하였다. 또한, 방사선치료는 분할조사에 의하여 6 내지 7주간 시행되므로 GBE 를 2 회 반복 투여하여 이의 효과를 살펴봄으로써 실제 임상적용시 방사선 치료와 GBE 병용 사용의 이론적 근거를 마련하였다는데

본 연구의 의의가 있다.

결 론

C3H 마우스의 섬유육종을 이용하여 GBE 투여에 의한 종양치유방사선량과 종양내 저산소세포분획의 변화 및 ^{31}P 핵자기공명 분광분석법에 의한 종양내 대사상태의 변화에 대한 실험결과는 다음과 같다.

1) 종양치유방사선량은 대조군에서는 69.6(66.8-72.5)Gy, GBE 1 회 투여시는 67.5 (64.1-71.7)Gy, 2 회 투여시는 62.2 (59.1-65.5)Gy 로서, 종양세포의 방사선에 대한 감수성은 GBE 를 2 회 투여시 현저히 증가하였다.

2) 저산소세포분획은 대조군에서는 10.6% 이었으며, GBE 1 회 투여시는 7.2% 로 다소 감소하였고, 2 회 투여시는 2.7% 로서 현저히 감소하였다.

3) ^{31}P 핵자기공명 분광분석 결과 측정 1 시간 전에 GBE 를 1 회 투여한 경우에는 대사 상태가 다소 호전되었으며, 24 시간 간격으로 2 회 투여한 경우에는 대사상태가 현저하게 호전되었다.

이상과 같은 결과를 종합해 볼 때, GBE 의 투여로 저산소세포분획이 감소되었고, 또한 대사상태가 호전됨으로써 종양세포의 방사선에 대한 감수성이 증가하였으며, 아울러 정상조직의 방사선 감수성에 영향을 끼치지 않는 것으로 알려져 있어, 항 후 방사선 치료에 사용시 치료효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10:695-712
2. van Putten LM, Kallman RF. Oxygenation status of a transplantable tumor during fractionated radiotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40:441-451
3. Hirst DG. Oxygen delivery to tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12:1271-1277
4. Kleijnen J, Knipschild P. Ginkgo biloba. *Lancet* 1992; 340:1136-1139
5. Chung KF, Dent G, McCusker M, et al. Effect of a ginkgolide mixture (BN 52063) in antagonising skin and platelet responses to platelet activating factor in man. *Lancet* 1987; i:248-251
6. Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, et al.

- On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:317-322
7. **Pagonis C, Tauber AI, Pavlotsky N.** Flavonoid impairment of neutrophil response. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:237-245
 8. **Heiss WD, Zeiler K.** The influence of drugs on cerebral blood flow. *Pharmacotherapie* 1978; 1:137-144
 9. **조문준, 이춘자, 하성환 외 1인.** Ginkgo biloba extract 가 C3H 마우스 섬유육종의 종양성장지연에 미치는 영향. *대한암학회지* 1995; 27:482-489
 10. **정웅기, 정현대, 하성환 외 1인.** 사이클로포스파마이드와 방사선 병용 요법시 종양의 크기가 치료 효과에 미치는 영향에 관한 연구. *대한암학회지* 1992; 24:109-124
 11. **Ha SW, Choi EK, Park CI.** Sequence and time interval in combination of irradiation and cis-diamminedichloroplatinum in C3H mouse fibrosarcoma. *J Korean Soc Ther Radiol* 1993; 11:29-34
 12. **Suit HD, Shalek RJ, Wette R.** Radiation response of C3H mouse mammary carcinoma evaluated in terms of cellular radiation sensitivity. In: *Cellular radiation biology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1965:514
 13. **Howess AE.** An estimation of changes in the proportions and absolute numbers of hypoxic cells after irradiation of transplanted C3H mouse mammary tumors. *Br J Radiol* 1969; 42:441-447
 14. **박성욱, 김미영, 임태환 외 4인.** 급성 심근 허혈-재관류에서 phosphorous metabolites의 회복에 대한 adenosine의 효과 : 고양이에서의 ³¹P NMR spectroscopy 를 이용한 분석. *순환기* 1993; 23:207-216
 15. **Brown JM.** Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumors and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol* 1979; 52:650-656
 16. **Guichard M, Courdi A, Malaise E.** Experimental data on the radiobiology of solid tumors. *J Eur Radiother* 1980; 1:171-191
 17. **Cohen MH.** Impairment of red blood cell deformability by tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 1979; 63:525-527
 18. **Warren BA.** The vascular morphology of tumors. In: *Tumor blood circulation: Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors*. HI Peterson ed. Florida: Boca Raton, CRC Press, Inc. 1979:1-47
 19. **van den Bogaert W, van der Schueren E, Horiot JC.** The feasibility of high-dose multiple daily fractionation (MDF) and its combination with anoxic cell sensitizers in the treatment of head and neck cancer. A pilot study of the EORTC Radiotherapy Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8:1649-1655
 20. **Dische S, Machin D, Chassagne D, et al.** A trial of Ro 03-8799 (pimonidazole) in carcinoma of the uterine cervix: an interim report from the Medical Research Council Working Party on advanced carcinoma of the cervix. *Radiother Oncol* 1993; 26:93-103
 21. **Mattson J, Peterson HI.** Influence of vasoactive drugs on tumor blood flow (review). *Anticancer Res* 1981; 1:59-61
 22. **박우윤, 하성찬, 박찬일.** C3H 마우스 섬유육종에서 hydralazine 과 온열치료의 병용효과. *대한암학회지* 1995; 27:671-679
 23. **Rockwell S.** Use of a perfluorochemical emulsion to improve oxygenation in a solid tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11:97-103
 24. **Teicher BA, Rose CM.** Perfluorochemical emulsions can increase tumor radiosensitivity. *Science* 1984; 223:934-936
 25. **Taillandier J, Ammar A, Rabourdin JP, et al.** Treatment of cerebral disorders due to aging with Ginkgo biloba extract. Longitudinal, multicenter, double-blind study versus placebo. *Presse Medicale* 1986; 15:1583-1587
 26. **Hoekel M, Vorndran B, Schlenger K, et al.** Tumor oxygenation: A new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecol oncol* 1993; 51:141-149
 27. **Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, et al.** Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991; 51:3316-3322
 28. **Gerweck LE, Urano M, Koutcher J, et al.** Relationship between energy status, hypoxic cell fraction, and hyperthermic sensitivity in a murine fibrosarcoma. *Radiat Res* 1989; 117:448-458
 29. **Okunieff P, Walsh CS, Vaupel P, et al.** Effects of hydralazine on in vivo tumor energy metabolism, hematopoietic radiation sensitivity, and cardiovascular parameters. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16:1145-1148
 30. **신경환.** Ginkgo biloba extract 가 마우스 피부 및 공장 소낭선의 방사선 감수성에 미치는 영향. *서울의대 의학석사 학위논문*. 1994

= 국문초록 =

Ginkgo Biloba Extract 가 C3H 마우스 섬유육종의 저산소세포 분획에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 치료방사선과학 교실¹⁾ 및 암 연구소²⁾, 원자력병원³⁾

조철구^{2, 3)} · 이춘자²⁾, 하성환^{1, 2)} · 박찬일¹⁾

목적 : C3H 마우스의 섬유육종에 있어서 저산소 분획 및 대사상태에 미치는 Ginkgo biloba extract (GBE) 의 영향을 알아보기 위해 본 실험을 시행하였다.

방법 : C3H 마우스의 우측 대퇴부에 이식한 섬유육종이 6mm 가 되었을때 TCD₅₀ 를 이용하여 저산소 세포 분획을 계산하였다. 방사선은 GBE (100mg/kg) 1회 투여시는 1시간 후에, 2회 투여시는 24시간 간격으로 2회 투여후 1시간 경과후 방사선을 조사하였으며, 산소공급이 충분한 상태와 결찰에 의한 저산소 상태에서 각각 조사하였다. 종양의 대사 상태 변화를 알아보기 위해 GBE 투여 전과 투여 후 1시간에 각각 ³¹P 핵자기 공명 분광분석법을 시행하였다.

결과 : 종양 치료방사선량은 결찰에 의한 저산소 상태시 81.7 (77.7 - 86.0) Gy, 정상 혈류 상태시는 69.6 (66.8 - 72.5) Gy 였으며, GBE 1회 투여한 경우에는 67.5 (64.1- 71.1) Gy, GBE 2회 투여시는 62.2 (59.1 - 65.5) Gy 로서, 2회 투여시 현저히 감소하였다. 이로부터 계산한 저산소 세포 분획은 정상 혈류 상태에서는 10.6%, GBE 1회 투여시는 7.2%로 다소 감소하였고, GBE 2회 투여시는 2.7% 로 현저히 감소하였다. ³¹P 핵자기공명분광분석결과 PCr/Pi 비는 대조군 0.27±0.04, GBE 1회 투여시는 0.40±0.04, 2회 투여시는 0.71±0.04로 GBE 2회 투여시 종양의 대사상태가 현저히 호전되었다.

결론 : 이상의 결과를 종합해 볼 때, GBE 의 투여에 의해 혈류량과 산소 및 영양분의 공급이 증가함에 따라, 저산소세포분획이 감소하였고, 종양의 대사 상태가 호전되어, 종양의 방사선에 대한 감수성이 높아졌다고 판단되었다.