

시험관내 YAC-1 세포주의 방사선 및 항암제감수성에 관한 연구

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실

최 의 환 · 고 광 준

목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

I. 서 론

암은 아직도 그 병인과 기전이 명확히 밝혀지지 않고 있지만 이를 정복하기 위한 연구자들의 꾸준한 연구결과 암치유율은 점차 향상되고 있다.

두경부암은 전체 암의 2~5%의 발생빈도를 보이며¹⁾ 두경부암 중 80% 이상이 편평세포암종으로 알려져 있다.

T1N0 또는 T2N0의 초기 두경부암의 경우에는 외과적수술 또는 방사선치료의 단독치료로서도 환자의 2년 생존율을 현저히 증가시킬 수 있게 되었다. 특히 방사선치료는 발음이나 연하 등의 기능적 및 심미적 관점에서 우수한 치료법으로 인정되고 있다. 그러나 T3 또는 T4의 진행성 두경부암의 경우에는 외과적수술이나 방사선치료를 시행하여도 암환자의 2년 생존율은 15~30%로 만족스럽지 못한 실정이다²⁾.

암환자 치료 후 환자 사망의 주원인은 50~60%가 국소제어의 실패이며 다음으로 원격전이, 이차암 등이다³⁾. 따라서 암환자의 국소제어율을 높이기 위하여 방사선치료와 외과적수술 또는 방사선치료와 화학요법의 병용요법이 진행성 두경부암환자의 치료에 많이 시행되고 있다. 또한 방사선치료와 화학요법을 병용하는 경우에는 방사선감수성과 항암제감수성이 암환자 치료의 성패를 결정하는 매우 중요한 요인이 된다. 따라서 암환자 치료시에는 방사선감수성과 항암제감수성, 그리고 암의 성장도와 같은 암조직의 생물학적 특성을 고려하여야 한다.

암환자의 방사선치료시에는 암조직 주위에 있는 정상조직의 손상을 최소화시키면서 암조직을 파괴시켜야 한다. 일반적으로 암세포의 방사선감수성은 그것이 유래하는 정상조직의 방사선감수성과 유사한데, 림프조직으로부터 유래된 악성림프종이나 백혈병 등은 방사선감수성이 높고 편평세포로부터 유래된 편평세포암종은 중등도 이상의 방사선감수성을 보인다.

항암제는 작용기전에 따라 알킬화제군, 항암성 항생물질군, 대사길항제군, 스테로이드 호르몬군, 유사분열 억제제군, 기타군의 여섯군으로 분류되는데 bleomycin은 항암성 항생물질군, cisplatin은 알킬화제군으로 분류된다. 1970년대부터 항암제를 이용한 유도화학요법이 두경부암환자에게 시행되었으나⁴⁾, 주로 재발된 말기의 두경부암 환자에게 증상 완화를 위해 시행되었다. 그

러나 1980년대 초기에 들어 원발암과 림프절에 현저한 세포독성반응을 보이는 cisplatin과 5-FU를 사용하는 복합화학요법이 개발되어 진행된 두경부암 치료에 대한 화학요법의 역할을 재평가하게 되었다⁵⁾. 특히 Rooney등⁶⁾은 국소 진행성 두경부암환자에서 cisplatin과 5-FU의 복합화학요법으로 높은 국소제어율을 보였다고 보고한 바 있다. 그러나 화학요법만의 치료에 반응하지 않거나 재발된 두경부암에 대하여는 효과적인 치료방법이 없을 뿐만 아니라 환자의 생존률도 매우 낮아 항암제와 방사선치료를 병용하는 병용요법이 개발되었다. 따라서 암조직의 이질성으로 볼 때 방사선치료, 화학요법, 또는 이들의 병용요법중에서 DNA ploidy, proliferating index, doubling time, predictive test 등의 증양의 특성을 나타내는 실험실조건과 환자의 정신적, 육체적인 건강을 기초로하여 개개인에 맞는 치료법이 이용되어야 한다⁵⁾. Stuschke등⁷⁾은 방사선 분할조사시 인체 암세포주 사이에 뚜렷한 이질성을 보여 각 암세포주의 생물학적 특성이 분할조사의 치료성패에 영향을 미친다고 보고한 바 있다.

악성림프종은 방사선감수성이 매우 높은 질환으로 알려져 있다. 림프종은 치료기준이 명확하게 제시되고 있는 것은 아니지만 T1N0 또는 T2N0의 초기 림프종의 경우에는 방사선치료를 시행하고 T3 또는 T4의 진행성 림프종의 경우에는 복합화학요법 또는 화학요법과 방사선치료의 병용요법이 주 치료법으로 알려지고 있다. Barton등⁸⁾은 초기 Hodgkin림프종을 방사선치료만으로 치료한 결과 높은 국소제어율을 보였다고 하였다.

방사선감수성에 관한 연구로는 인체의 정상세포를 대상으로 한 연구^{9,10)}, 인체의 정상세포와 암세포주에 대한 비교연구¹¹⁾, 인체의 암세포주에 대한 연구^{12,13)} 등이 있다. 또한 West등¹⁴⁾은 정상인과 암환자에서 채취한 림프구에 대한 방사선감수성을 비교연구하였으며, Pekkola-Heino등¹⁵⁾은 두경부의 다양한 부위에서 발생한 편평세포암종의 방사선감수성, Siles등¹⁶⁾은 인체 암세포주의 방사선감수성과 p53과의 관계를 보고한 바

있다.

한편 항암제감수성에 관한 연구로는 Park등¹⁷⁾, Carmichael등¹⁸⁾, Schroyens등¹⁹⁾, Sevin등²⁰⁾, Takahara²¹⁾, Nio등²²⁾, Fujisaki등²³⁾, Pu등²⁴⁾, Chua등²⁵⁾의 보고가 있다.

항암제감수성의 실험에는 크게 in vivo 또는 in vitro검색법이 있는데 in vitro 검색법으로는 radio-metric분석법²⁶⁾, dye exclusion분석법²⁷⁾, human tumor clonogenic분석법(HTCA)²⁸⁾, scintillation분석법²⁹⁾, sulforhodamine B(SRB)분석법³⁰⁾, bicinehoninic acid(BCA) 분석법³¹⁾, MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl])-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)분석법³²⁾ 등이 있다. 이중 MTT분석법은 실험결과와의 재관성 및 재현성이 우수하여 초기검색이나 대량검색에 적합하며 정량적으로 단기간의 세포독성반응을 평가하는데 유용하다.

MTT분석을 이용한 연구로는 인체 암세포주를 대상으로 한 연구^{17,33)}, 갑상선암의 항암제감수성³⁴⁾, 소아의 non-lymphoblastic leukemia의 항암제감수성³⁵⁾ 그리고 방사선감수성과 항암제감수성을 동시에 평가한 연구⁵⁾ 등이 있다.

현재까지 암세포주의 방사선감수성 또는 항암제감수성에 대한 많은 연구가 진행되어왔으나 이들을 동시에 평가한 연구는 희유하며, 특히 YAC-1 세포주는 배양 및 연구방법등의 어려움으로 인해 이에 대한 연구가 드문 실정이다.

본 연구는 YAC-1 세포주에 대한 방사선 및 항암제감수성 실험으로써 향후 두경부암환자의 치료시 치료반응을 예측하는 기초자료로서 암환자 치료에 다소나마 도움을 주고자 하는데 그 목적이 있다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 암세포주

Mouse lymphoma YAC-1 세포주를 10% D-FBS[Fetal Bovine Serum (M.A. Bioproducts, Walkersville, MD)]와 streptomycin, penicillin이

Table 1. Radiation Surviving Fraction of YAC-1 in MTT assay

Dose	Surviving Fraction	
Control	0.72 ± 0.02	
2Gy	0.62 ± 0.00] a*
4Gy	0.60 ± 0.03	
6Gy	0.58 ± 0.01	
8Gy	0.51 ± 0.01] b*
0Gy	0.47 ± 0.00	

*Significant by one-way ANOVA & Scheffé test (P < 0.05)

각각 100 μ g/ml, 100units/ml씩 함유된 RPMI 1640[Roswell Park Memorial Institute(Gibco, Grand Island, N.Y.)]배양액을 사용하여 온도 37 $^{\circ}$ C, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂배양기에서 배양하였다. YAC-1 세포주를 96 well plate에 3 \times 10⁴ cells/ml되도록 분주하였다.

(2) 방사선조사

실온에서 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8을 이용하였다.

(3) 항암제

bleomycin sulfate[Nippon Kayaku Co.], cisplatin[Bristol-Myers, S.A.E.]을 0.15M NaCl용액과 혼합하여 사용하였고, 실험기간중에는 -70 $^{\circ}$ C 냉암소에 보관하였다. 실험에 사용한 약제의 농도는 2 μ g/ml를 중심으로 0.2 μ g/ml, 20 μ g/ml로 구분하여 MTT분석에 적용하였다.

2. 실험방법

(1) 방사선 단독조사

YAC-1 세포주에 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8을 이용하여 선량을 210 cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10Gy를 단회 조사하였으며, SSD는 60Cm, 조사야는 15 \times 20 Cm²이었다.

(2) 항암제 단독투여

YAC-1세포주에 bleomycin 또는 cisplatin을 0.2, 2, 20 μ g/ml 농도로 구분하여 단독투여하였다.

(3) 방사선조사 후 항암제투여

방사선조사 직후 2 μ g/ml 농도의 bleomycin, cisplatin이 함유된 배양액에 YAC-1 세포를 넣어 현탁액을 만들고 온도 37 $^{\circ}$ C, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂ 배양기에 1시간 방치한 후 동일한 방법으로 2회 원침하여 항암제를 세척하였다. 96 well plates에 RPMI배양액 2ml를 혼합하고 상기 조건하의 배양기에서 암세포주를 4일간 배양한 후 실험에 적절한 세포주의 증식을 확인하였다. 세포주는 흡광도 측정 4시간 전에 MTT 5mg/ml가 혼합된 배양액을 각 well당 200 μ l씩 넣어 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 100 μ l/well씩 넣어 15분간 실온에 방치한 후, 세포내 형성된 MTT formazan product를 용해하여 분광광도계 570nm에서 용해된 MTT의 흡광도를 scanning multiwell spectrophotometer(Enzyme-Linked Immunosorbant Assay Reader: Biotek Instruments, Inc. Burlington, VT)로 측정하여 세포독성의 백분율을 구하고 이를 대조군과 비교하였으며, 모든 실험은 3회 반복하였다.

III. 실험성적

1. 대조군

YAC-1 세포주는 분주 후 배양액내에서 부유되어 성장하였다. MTT분석에서 방사선 단독조사군의 4일째 YAC-1 세포주의 최적밀도(optimal density)는 0.72 \pm 0.02(3 \times 10⁴cells/ml)이었다(Table 1). 한편 bleomycin, cisplatin 단독투여군의 4일째 YAC-1 세포주의 최적밀도는 0.40 \pm 0.01(3 \times 10⁴cells/ml)이었다(Table 2).

2. 실험군

(1) 방사선 단독조사군

방사선조사 후 4일째 YAC-1 세포주는 2, 4, 6,

Table 2. Effect of Antitumor Drugs on YAC-1 in MTT assay

Drug	Concentration			
	Control	0.2	2 [†]	20
Bleomycin	0.40±0.01	0.37±0.00*	0.20±0.03*	0.14±0.02*
Cisplatin	0.40±0.01	0.25±0.04*	0.12±0.00*	0.08±0.00*

The Values are Surviving Fractions(Mean±S.D.)

† Peak Plasma Concentration(μg/mg)

* T-test(P<0.01)

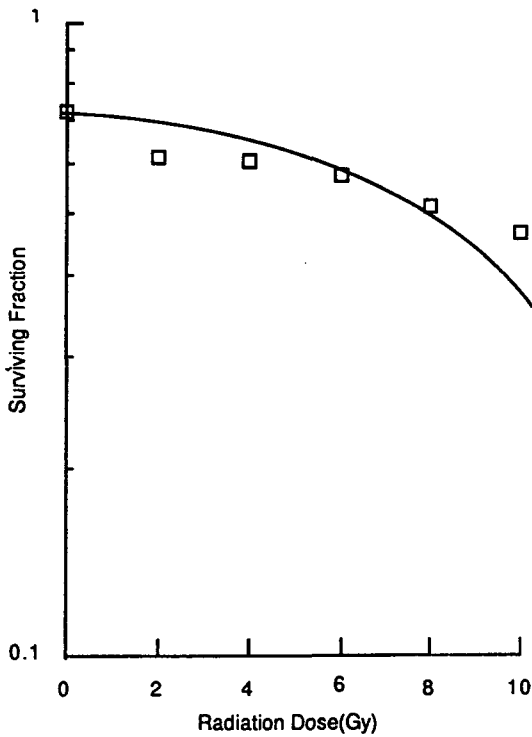


Figure 1. Radiation Surviving Fraction of YAC-1 in MTT assay

8, 10Gy 모든 선량에서 방사선량이 증가함에 따라 세포생존율이 감소되었으며(Table 1), 완전한 기울기의 세포 생존곡선을 나타내었다(Figure 1). 한편 2Gy, 4Gy 및 6Gy사이, 그리고 8Gy와 10Gy사이에서는 유의한 세포생존율의 차이를 보이지 않았다.

(2) 항암제 단독투여군

YAC-1 세포주에 bleomycin 또는 cisplatin을

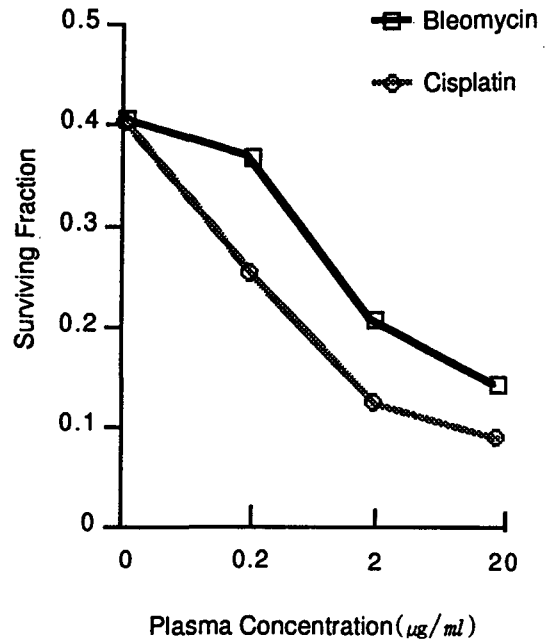


Figure 2. Effect of Antitumor Drugs on YAC-1 in MTT assay

단독투여한 경우 0.2, 2, 20μg/ml 모든 농도에서 세포생존율이 감소되었다(P<0.01). 또한 0.2, 2, 20μg/ml의 모든 농도에서 cisplatin이 bleomycin 보다 세포독성효과가 더 크게 나타났다(Table 2, Figure 2, P<0.01).

(3) 방사선조사 후 항암제투여군

YAC-1 세포주에 방사선조사와 2μg/ml의 bleomycin을 병용한 경우 방사선량이 증가함에 따라 세포생존율이 감소되었다(Table 3, Figure 3). 한편 bleomycin을 병용한 경우 4Gy, 6Gy 및 8Gy사이에서는 유의한 세포생존율의 차이를 보

Table 3. Effect of Radiation and Bleomycin on YAC-1 in MTT assay

Dose	Surviving Fraction	
	Radiation Only	Radiation+ Bleomycin(2 [†])
2Gy	0.62±0.00	0.51±0.03 ^{a*}
4Gy	0.60±0.03	0.40±0.02 ^{b*}
6Gy	0.58±0.01	0.38±0.01
8Gy	0.51±0.01	0.34±0.00
10Gy	0.47±0.00	0.28±0.01 ^{c*}

The Values are Mean±S.D.

[†]Peak Plasma Concentration(μg/ml)

*Significant by ANOVA & Scheffé test (P<0.05)

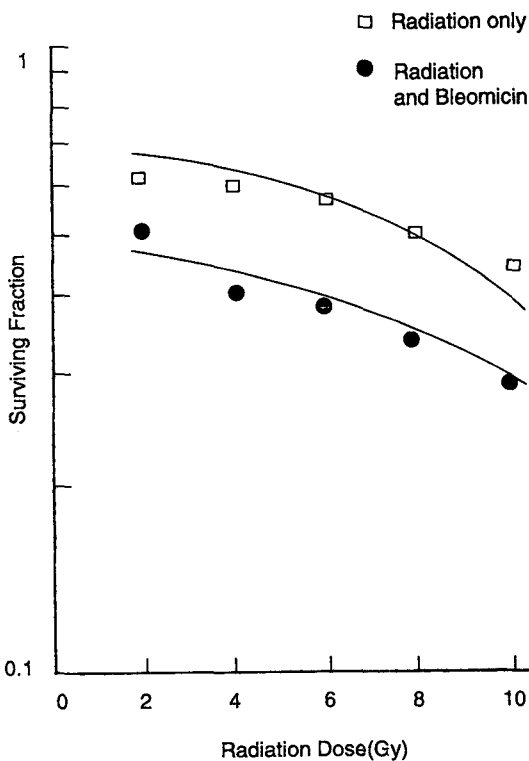


Figure 3. Effect of Radiation and Bleomycin on YAC-1 in MTT assay

이지 않았다. YAC-1 세포주에 방사선조사와 2 μg/ml의 cisplatin을 병용한 경우에도 방사선량이

Table 4. Effect of Radiation and Cisplatin on YAC-1 in MTT assay

Dose	Surviving Fraction	
	Radiation Only	Radiation+ Cisplatin(2 [†])
2Gy	0.60±0.06	0.18±0.01
4Gy	0.56±0.01	0.16±0.00
6Gy	0.53±0.01	0.15±0.00
8Gy	0.52±0.01	0.14±0.00
10Gy	0.50±0.00	0.13±0.00*

The Values are Mean±S.D.

[†]Peak Plasma Concentration(μg/ml)

*Significant by ANOVA & Scheffé test (P<0.05)

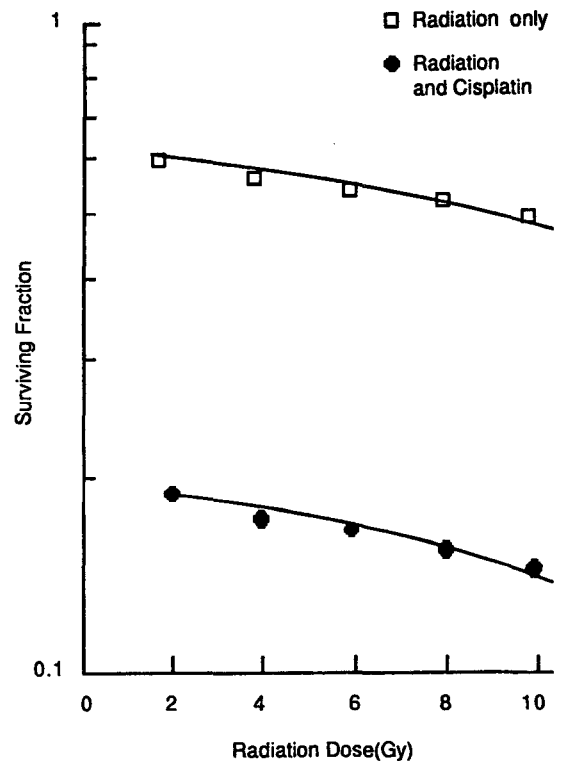


Figure 4. Effect of Radiation and Cisplatin on YAC-1 in MTT assay

증가함에 따라 세포생존율이 감소되었다(Table 4, Figure 4). 한편 cisplatin을 병용한 경우에는

2Gy와 10Gy에서 유의한 세포생존율의 차이를 나타내었다($P<0.05$). 또한 방사선단독조사군과 방사선조사와 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 경우 두 군 사이에서는 2, 4, 6, 8, 10Gy 모든 선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 보였다($P<0.05$).

VI. 총괄 및 고안

초기의 두경부암은 방사선치료 또는 외과적수술 단독치료로서 비교적 만족할만한 국소제어율을 보이지만 진행된 두경부암은 외과적수술 또는 화학요법과의 병용요법에도 불구하고 아직까지 암환자의 생존율은 만족스럽지 못하다.

방사선치료는 일반적으로 정상세포보다 암세포가 생물학적 손상을 받기 쉬운 성질을 이용한다. 따라서 방사선치료는 조사방사선에 의한 인접 정상조직의 손상을 허용하는 범위내에서 암세포를 사멸시키거나 적어도 암조직의 성장을 억제시킨다. 일반적으로 외방성으로 풍부한 혈관분포를 가지는 암조직은 조사방사선에 의하여 그 크기가 빠르게 감소되며 높은 국소제어율을 나타낸다. 그러나 인접조직으로 침윤성인 암조직은 조사방사선에 의하여 그 크기가 서서히 감소되고 잔존 암세포에 의하여 높은 재발율을 보인다.

최근 방사선생물학적 예후인자인 클론형성세포수, 방사선감수성, proliferation kinetics 등에 대한 관심이 높아지고 있다. 각종 암환자에게 방사선치료를 시행하기 전에 그 치료결과를 예측하고 치료효과를 높이기 위해서는 암세포의 방사선감수성을 미리 파악하는 것이 매우 중요하다^{36,37}. 암세포의 방사선감수성은 방사선 선량과 세포생존율과의 관계를 그래프로 표시한 세포생존곡선을 이용하여 알 수 있다. 1956년 Puck과 Marcus³⁸는 HeLa세포의 재생능력에 대한 방사선의 효과를 정량적 방법으로 연구하여 처음으로 세포생존곡선을 작성하였다. Fertii과 Malaise³⁹는 세포생존곡선에서 저선량부위의 기울기 차이로 방사선치료시 나타나는 반응의 차이를 밝혀낼 수 있는지를 연구하였는데 이들은 과

거에 발표된 다양한 암세포주의 세포생존율의 자료를 생존곡선모델에 적용하여 2Gy 방사선 선량에서의 세포생존율을 평가하였다. 그 결과 세포주의 방사선에 대한 감수성을 결정하는데 중요한 기준척도는 2Gy 방사선 선량에서의 세포생존율이라고 보고하였다. 세포생존곡선의 기울기는 방사선감수성의 지표가 되고 그 기울기가 클수록 방사선감수성이 높아진다. 따라서 세포생존곡선의 기울기로 암환자의 방사선치료 가능성 여부를 알 수 있다. 김과 고⁴⁰는 YAC-1 세포주는 2, 4, 6, 8, 10Gy 모든 선량에서 방사선량이 증가됨에 따라 세포생존율이 감소되었다고 보고하였으며, 6Gy와 8Gy사이에는 유의한 세포생존율의 차이를 보이지 않았다고 보고하였다.

본 연구에서도 방사선량이 증가함에 따라 세포생존율의 감소를 보였으나 2Gy, 4Gy 및 6Gy 사이 그리고 8Gy와 10Gy 사이에서는 유의한 세포생존율의 차이를 보이지 않았다.

방사선을 조사받은 세포는 분열지연이나 분열기간 동안 세포사가 일어난다. 저선량의 방사선에 의하여 G2기 세포에서 약간의 분열지연이 야기되며, 이 분열지연된 세포는 계속적으로 세포분열지연이 증가되고 다른 지연되지 않은 세포와 함께 세포분열을 하게 된다. 또한 증등도의 방사선조사시 더 긴 세포분열지연을 일으키게 되고 일부 세포는 사멸된다. 따라서 방사선조사 후 세포변화를 보이려면 충분한 시간이 경과되어야한다⁴¹.

본 연구에서는 예비실험을 시행하여 YAC-1 세포주에 대한 적절한 세포수 및 항암제 농도를 결정하였으며, 방사선과 항암제에 의한 세포사까지의 충분한 시간을 부여하기 위하여 방사선조사 4일 후 YAC-1 세포주의 세포생존율을 구하였다.

방사선치료시 총방사선량을 조사하는 경우 단회조사보다는 분할조사하여 저선량을 장기간 조사함으로써 암세포의 파괴를 증가시키고 정상조직은 방사선손상으로부터의 회복을 기대할 수 있다. 이처럼 분할조사시의 방사선 생물학적 이점은 분할조사내에 일어나는 조직세포의 준치사손상(sublethal damage)으로부터의 회복이 정상

조직에서 더 현저하다는 점과, 세포분열 과정에서의 재분포(redistribution), 재군집화(repopulation) 및 종양조직에서 일어나는 재산소화(reoxygenation)가 방사선효과를 증가시켜준다는 점이다⁴²⁾. 한편 Anna등⁴³⁾은 인체 종양세포는 잠재적 배가시간이 매우 길어 재군집화가 일어나는데 오랜시간이 걸리므로 방사선 분할조사는 다른 생물학적 요소보다 치료효과에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 YAC-1 세포주에 방사선을 단회 조사하였으며 향후 단회조사시와 분할조사시 YAC-1 세포주의 세포생존율의 차이를 비교하여야 할 것으로 사료된다.

bleomycin은 수용성의 당펩타이드로서 피부, 폐 등의 편평세포암종과 두경부암에 대한 치료 효과가 높다. bleomycin은 항암성 항생물질로서 암세포의 DNA 합성을 방해하고 DNA 사슬의 절단을 일으키며 G2기의 세포에만 작용하는 것으로 알려져 있다. 한편 cisplatin은 단독투여시 다른 항암제보다 더 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 작용기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않지만 알킬화제로서 DNA 합성 방해와 DNA 사슬 사이에 교차가 형성되어 세포에 치명적 장해를 주는 것⁴⁴⁾으로 알려져 있다. cisplatin은 증식하는 모든 세포에 작용하며, 오심과 구토 등의 부작용이 있어 장기간 또는 효과적인 용량까지의 투여에는 어려움이 있다⁴⁵⁾. 한편 Drewinko등⁴⁶⁾은 cisplatin을 암세포에 장기간 투여하면 cisplatin의 세포독성효과가 커진다고 보고하였다. 또한 cisplatin은 Non-Hodgkin림프종, 골육종, 폐암, 고환암 등에 강한 항암효과를 나타내지만 선세포암, 유방암, 흑색종 등에는 항암효과가 비교적 적은 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 두경부암에 효과가 있는 bleomycin과 cisplatin을 YAC-1세포주에 단독투여하였을 때 cisplatin이 bleomycin보다 0.2, 2, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 모든 농도에서 세포독성효과가 더 크게 나타났다.

한편 cisplatin 또는 bleomycin 등의 항암제투여시에는 이의 단독투여보다 방사선조사를 병용하였을 때 높은 항암효과를 얻을 수 있는 것으로

알려져 있다. Al-Sarraf등⁴⁷⁾은 선행항암요법에 실패한 진행성 두경부암환자에 대하여 cisplatin과 방사선치료를 병용함으로써 좋은 치료효과를 얻었다고 보고한 바 있다. Smid등⁴⁸⁾은 bleomycin 및 mytomycin C와 방사선치료를 병용하였을 때, 방사선치료만을 시행하였을 때보다 더 항암효과가 컸다고 하였다. Britten등⁴⁹⁾은 cisplatin과 방사선치료를 병용한 결과 높은 국소제어율을 보인 것은 cisplatin의 세포독성때문이라고 보고하였으며 방사선의 분할조사량을 증가시키는 것 보다는 cisplatin의 총투여량을 증가시킴으로써 국소제어율을 높일 수 있다고 하였다.

본 연구에서도 방사선조사와 cisplatin 또는 bleomycin을 병용한 결과, 방사선 단독조사시와 비교하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였다.

최근에는 화학요법을 먼저 시행한 후 방사선조사를 병용함으로써 더 높은 항암효과를 나타내는 것²⁾으로 보고되고 있다. Lelieveld등⁵⁰⁾은 방사선조사 전 cisplatin을 하루에 한 번 또는 분할하여 투여하였을 때 더 높은 항암효과를 나타냈다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 방사선조사 직후 bleomycin과 cisplatin을 투여하였다. 따라서 bleomycin 또는 cisplatin의 방사선증강효과 또는 부가효과에 대해서는 향후 방사선조사 전후의 세포생존율에 대한 비교연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 YAC-1 세포주에 방사선을 단독 조사한 군과 방사선조사와 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 군 사이의 세포생존율은 유의한 차이를 나타내었다. 따라서 방사선 단독조사시보다 항암제를 병용한 경우 YAC-1 세포주에 대한 세포독성효과가 더 컸으며 특히 bleomycin보다 cisplatin을 병용한 경우 그 효과가 크게 나타났다.

본 연구에서 항암제감수성시험에는 MTT분석법을 이용하였으며 Wilson이 추천한 용해제인 DMSO를 사용하여 formazan의 용해성을 증가시켰고 spectrophotometer로 흡광도 측정시 570nm의 흡광도를 이용하였다. 그러나 MTT분석법은 실제 환자에게 적용하기에는 어려움이 있으며 최근에는 더 정확하고 신속한 방법들이

개발되고 있어 향후 연구에서는 MTT분석법과 더불어 다른 분석법도 함께 연구되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구는 YAC-1세포주에 대한 방사선 단독 조사와 항암제 단독투여 그리고 방사선조사와 항암제를 병용한 후 세포독성효과를 평가한 연구로서 향후 방사선 분할조사에 대한 효과와 방사선 및 항암제감수성을 증가시킬 수 있는 다른 약제들에 대한 효과에 대해서도 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 암환자의 생존율을 높이기 위해서는 암세포의 특성들이 명확히 규명되어야 함은 물론 방사선치료 및 항암요법 이외의 면역요법 등도 병행하여 연구되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

방사선 및 항암제의 세포독성반응을 알아보기 위하여, 실험실에서 배양된 mouse lymphoma YAC-1 세포주를 대상으로 방사선 단독조사군은 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사하였으며, 항암제 단독투여군은 0.2, 2, 20 μ g/ml 농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여하였다. 또한 방사선조사와 항암제를 병용한 경우에는 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사한 직후 2 μ g/ml 농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 투여하였다. 각각의 실험방법에 따른 세포생존율을 구하고 세포생존곡선을 작성한 후 세포독성반응을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. YAC-1 세포주에 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단독조사한 경우 세포생존곡선은 완만한 기울기를 나타내었다.
2. YAC-1 세포주에 대한 bleomycin 또는 cisplatin의 세포독성반응은 0.2, 2, 20 μ g/ml의 모든 농도에서 세포생존율이 감소되었으며, cisplatin이 bleomycin보다 세포독성효과가 더 크게 나타났다($P < 0.01$).
3. YAC-1 세포주에 방사선을 단독조사한 경우와 방사선조사와 2 μ g/ml의 bleomycin을 병용한 경우 4Gy, 6Gy 및 8Gy사이에서는 유의한

세포생존율의 차이를 보이지 않았다.

4. YAC-1 세포주에 방사선을 단독조사한 경우와 방사선조사와 2 μ g/ml의 cisplatin을 병용한 경우 2Gy와 10Gy에서 유의한 세포생존율의 차이를 나타내었다($P < 0.05$).
5. 방사선 단독조사군과 방사선조사와 2 μ g/ml의 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 경우 두 군 사이에서는 2, 4, 6, 8, 10Gy의 모든 선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 보였다($P < 0.05$).

참고문헌

1. Hong, W.K. and Shasphay, S.M. : Treatment of previously untreated stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol. Clin. N. Am.*, 13:521-528, 1980.
2. Glick, J.H., Marcial, V., Richter, M. and Velez-Garcia, E. : The adjuvant treatment of inoperable stage III and IV epidermoid carcinoma of the head and neck with platinum and bleomycin infusions prior to definitive radiotherapy: An RTOG pilot study, *Cancer*, 46:1919-1924, 1980.
3. Jaulerry, C., Rodriguez, J., Brunin, F., Jouve, M., Mosseri, V., Point, D., Pontvert, D., Validire, P., Zafrani, B., Blaszk, B., Asselain, B., Pouillart, P. and Brugère, J. : Induction chemotherapy in advanced head and neck tumors : Results of two randomized trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 23:483-489, 1992.
4. Choksi, A.J., Dimery, I.W. and Hong, W.K. : Adjuvant chemotherapy of head and neck cancer : The past, the present, and the future. *Semin. Oncol.*, 15: 45-59, 1988.
5. 나승목, 고광준 : B16세포주의 방사선 및 항암제감수성에 관한 실험적 연구. *치과방사선*, 25(2):331-341, 1995.
6. Rooney, M., Kish, J., Jacobs, J. Kinzie, J., Weaver, A., Crissman, J. and Al-Sarraf, M. : Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin. *Cancer*, 55: 1123-1128, 1985.
7. Stuschke, M., Budach, V., Stüben, G., Streffer, C. and Sack, H. : Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines: studies in a three-dimensional model system. *Int. J. Radiat.*

- Oncol. Biol. Phys., 32:395-408, 1995.
8. Barton, M., Boyages, J., Crennan, E., Davis, S., et al : Radiation therapy for early stage Hodgkin's disease : Australasian patterns of care. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 31:227-236, 1995.
 9. Geara, F.B., Peters, L.J., Ang, K.K., Wike, J.L. and Brock, W.A. : Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 27:1173-1179, 1993.
 10. Dittmann, K., Löffler, H., Bamberg, M. and Rode-
mann, H.P. : Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-
induced differentiation of human fibroblasts in
culture. *Radiother. Oncol.*, 34:137-143, 1995.
 11. Hall, E.J., Marchese, M.J., Astor, M. B. and Morse,
T. : Response of cells of human origin, normal and
malignant, to acute and low dose rate irradiation.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 12:655-659, 1986.
 12. Matthews, J.H.L., Meeker, B.E. and Chapman, J.D.
: Response of human tumor cell lines in vitro to
fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol.
Phys.*, 16:133-138, 1989.
 13. Girinsky, T., Lubin, R., Pignon, J. P., Chavaudra, N.,
Gazeau, J., Dubray, B., Cosset, J. M., Socie, G. and
Fertil, B. : Predictive value of in vitro radiosensi-
tivity parameters in head and neck cancers and
cervical carcinomas : Preliminary correlations with
local control and overall survival. *Int. J. Radiat.
Oncol. Biol. Phys.*, 25:3-7, 1993.
 14. West, C.M.L., Elyan, S.A.G., Berry, P., Cowan, R.
and Scott, D. : A comparison of the radiosensitivity
of lymphocytes from normal donors, cancer patien-
ts, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T)
and A-T heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 68:197
-203, 1995.
 15. Pekkola-Heino, K., Jaakkola, M., Kulmala, J. and
Grénman, R. : Comparison of cellular radiosensi-
tivity between different localizations of head and
neck squamous-cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin.
Oncol.*, 121:452-456, 1995.
 16. Siles, E., Villalobos, M., Valenzuela, M.T., Núñez,
M.I., Gordon, A., McMilian, T.J., Pedraza, V. and
Ruiz de Almodóvar, J.M. : Relationship between
p53 status and radiosensitivity in human tumour
cell lines. *Br. J. Cancer*, 73:581-588, 1996.
 17. Park, J.G., Kramer, B.S., Steinberg, S.M., Carmi-
chael, J., Collins, J.M., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. :
Chemosensitivity testing of human colorectal car-
cinoma cell lines using a tetrazolium-based colori-
metric assay. *Cancer Research*, 47:5875-5879, 1987.
 18. Carmichael, J., Mitchell, J.B., DeGraff, W.G., Gam-
son, J., Gazdar, A.F., Johnson, B.E., Glatstein, E.
and Minna, J.D. : Chemosensitivity testing of
human lung cancer cell lines using the MTT assay.
Br. J. Cancer, 57:540-547, 1988.
 19. Schroyens, W., Tueni, E., Dodion, P., Bodecker, R.,
Stoessel, F. and Klastersky, J. : Validation of
clinical predictive value of in vitro colorimetric
chemosensitivity assay in head and neck cancer.
Europ. J. Cancer, 26:834-838, 1990.
 20. Sevin, B.U., Perras, J.P., Averette, H.E., Donato,
D.M. and Penalver, M. : Chemosensitivity testing
in ovarian cancer. *Cancer*, 71:1613-1620, 1993.
 21. Takahara, T. : Growth chamber assay, a chemo-
sensitivity test to eliminate normal stromal cells.
Nippon Geka Gakkai Zasshi, 96:59-71, 1995.
 22. Nio, Y., Tamura, K., Tsubono, M., Kawabata, K.,
Masai, Y., Hayashi, H., Ishigami, S.I., Araya, S.I.
and Imamura, M. : Anticancer chemosensitivity
changes between the original and recurrent tumors
after successful chemotherapy selected according to
the sensitivity assay. *Annals of Surgery*, 221:89
-99, 1995.
 23. Fujisaki, T., Wada, T., Takahashi, M., Yamawaki,
S. and Ishii, S. : In vitro chemosensitivity assay for
human osteosarcoma using tumor xenografts.
Clinical Orthopaedics and Related Research, 313:279
-285, 1995.
 24. Pu, Y.S., Hsieh, T.S., Tsai, T.C., Cheng, A.L., Hsieh
, C.Y., Su, I.J. and Lai, M.K. : Tamoxifen enhances
the chemosensitivity of bladder carcinoma cells.
The Journal of Urology, 154:601-605, 1995.
 25. Chua, T.P., Clark, A.L., Amadi, A.A. and Coats, A.J.
: Relation between chemosensitivity and the
ventilatory response to exercise in chronic heart
failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 27:650-657, 1996.
 26. Von Hoff, D.D., Forseth, B. and Warfel, L.E. : Use
of radiometric system to screen for antineoplastic
agents : Correlation with a human tumor cloning
system. *Cancer Res.*, 45:4032-4038, 1985.
 27. Weisenthal, L.M., Morsden, J.A., Dill, P.L. and
Macaluso, C.K. : A novel dye exclusion method for
testing in vitro chemosensitivity of human tumors.
Cancer Res., 43:749-757, 1983.
 28. Hamburger, A.W. and Salmon, S.E. : Primary bio-

- assay of human tumor stem cells. *Science*, 197:461-463, 1977.
29. Tanigawa, N., Kern, D.H., Hikasa, Y. and Morton, D.L.: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res.*, 42:2159-2164, 1982.
 30. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, T.J., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:1107-1112, 1990.
 31. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analy. Biochem.*, 150:76-85, 1985.
 32. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83:757-766, 1991.
 33. Campling, B.G., Pym, J., Galbraith, P.R. and Cole, S.P.C.: Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemia Research*, 12:823-831, 1988.
 34. Sasaki, F., Ishimura, H., Takada, N. and Uchino, J.: Chemosensitivity test for thyroid cancer by in vitro MTT assay. *Gan. To. Kagaku. Ryoho.*, 22:1771-1781, 1995.
 35. Klumper, E., Pieters, R., Kaspers, G.J., Huismans, D.R., Loonen, A.H., Rottier, M.M., et al: In vitro chemosensitivity assessed with the MTT assay in childhood acute non-lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 9:1864-1869, 1995.
 36. 고경환, 하성환, 박찬일: 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구. *대한치료방사선학회지*, 11:17-27, 1993.
 37. Brock W.A., Baker, F.L., Wike, J.L., Sivon, S.L. and Peters, L.J.: Cellular radiosensitivity of primary head and neck squamous cell carcinoma and local tumor control. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 18:1283-1286, 1990.
 38. Puck, T.T. and Marcus, P.I.: Action of X-rays on mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 103:653-667, 1956.
 39. Fertil, B. and Malaise, E.P.: Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 7:621-629, 1981.
 40. 김민숙, 고광준: 수종의 암세포주의 저선량 방사선감수성에 관한 실험적 연구. *치과방사선*, 24(2):249-261, 1994.
 41. Goaz, P.W. and White, S.C.: *Oral Radiology: Principles and interpretation*. 3rd ed. Mosby-year book, Inc. pp 24-46, 1994.
 42. 고병희, 함창국, 김정진: 단일조사와 분할조사시 마우스 공장 소낭세포의 방사선효과에 관한 실험적 연구. *대한치료방사선학회지*, 3:1-8, 1985.
 43. Anna, K., Speke, M. and Richard, P.: Repopulation kinetics during fractionated irradiation and the relationship to the potential doubling time. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, 31:847-856, 1995.
 44. 김문중: 암화학적요법, 서광의학서립, pp 43-48, 1991.
 45. Herman, T.S., Einhorn, L.H., Jones, S.E., et al: Superiority of nabilone over prochlorperazine as an antiemetic in patients receiving cancer chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 300:1295-1297, 1979.
 46. Drewinko, B., Patchen, M., Yang, L.Y. and Barlogie, B.: Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferation and nonproliferating human tumor cells. *Cancer Research*, 41:2328-2333, 1981.
 47. Al-Sarraf, M., Pajak, T.F., Cooper, J.S. et al: Chemoradiotherapy in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma: A radiation therapy oncology group study. *J. Clin. Oncol.*, 8:1342-1351, 1990.
 48. Smid, L., Lesnicar, H., Zakotnik, B., Soba, E., Budihna, M., Furlan, L., Zargi, M. and Rudolf, Z.: Radiotherapy, combined with simultaneous chemotherapy with mitomycin C and bleomycin for inoperable head and neck cancer-preliminary report. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 32:769-775, 1995.
 49. Britten, R.A., Evans, A.J., Allalunis-Turner, M.J. and Pearcey, R.G.: Effect of cisplatin on the clinically relevant radiosensitivity of human cervical carcinoma cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 34:367-374, 1996.
 50. Lelieveld, P., Scoles, M.A., Brown, J.M. and Kallman, R.F.: The effect of treatment in fractionated schedules with the combination of X-irradiation and six cytostatic drugs on the RIF-1 tumor and normal mouse skin. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11:111-121, 1985.

- ABSTRACT -

A Study on the Radiosensitivity and Chemosensitivity of YAC-1 Cell Line in Vitro

Eui-Hwan Choi, Kwang-Joon Koh

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Chonbuk National University

The purpose of this study was to aid in the prediction of tumor cell tolerance to radiotherapy and/or chemotherapy. For this study, cell surviving curves were obtained for mouse lymphoma YAC-1 cell line using semiautomated MTT assay.

2, 4, 6, 8, 10Gy were irradiated at a dose rate of 210cGy/min using ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8. After irradiation, YAC-1 cell lines(3×10^4 cells/ml) were exposed to bleomycin or cisplatin for 1 hour.

The viable cells were determined for each radiation dose and/or each concentration of drug at the 4th day. And they were compared to control values.

The obtained results were as follows :

1. The surviving curve with gentle slope was obtained after irradiation of 2, 4, 6, 8, 10 Gy on YAC-1 cell line.
2. The cytotoxicity of bleomycin or cisplatin was increased significantly at all concentration of 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml and 20 μ g/ml on YAC-1 cell line ($P < 0.01$). And the cytotoxicity of cisplatin was greater than that of bleomycin at all concentration on YAC-1 cell line ($P < 0.01$).
3. There were no significant differences of surviving fractions among 4Gy, 6Gy and 8Gy after irradiation of each radiation dose with 2 μ g/ml of bleomycin compared with irradiation only on YAC-1 cell line.
4. There was significant difference of surviving fraction between 2Gy and 10Gy after irradiation of each radiation dose with 2 μ g/ml of cisplatin compared with irradiation only on YAC-1 cell line($P < 0.05$).
5. There were significant differences of surviving fractions between the groups of irradiation only and the groups of irradiation with 2 μ g/ml of bleomycin or cisplatin at all doses of 2, 4, 6, 8 and 10Gy on YAC-1 cell line($P < 0.05$).