

시험관내 A-253 세포주의 방사선 및 항암제 감수성에 관한 연구

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실

이 주 현 · 황 의 환 · 이 상 래

목 차

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

I. 서 론

암환자의 치료에는 외과적 수술 또는 방사선 단독치료와 외과적 수술 전, 후 방사선치료 또는 암화학요법 그리고 방사선치료와 암화학요법과의 병용치료법 등이 이용되고 있다. 두경부암 중 T1N0와 T2N0 초기암은 방사선치료 또는 외과적 수술의 단독치료로써도 만족할만한 국소제어를 나타내고 있지만 T3, T4 진행암에서는 일반적으로 방사선치료 또는 외과적 수술요법과 함께 암화학요법의 병용요법에 의한 치료가 이루어지고 있다.

암환자 치료결과에 크게 영향을 미치는 요인으로서 암세포의 방사선감수성과 항암제감수성이 알려져 있다. 암세포는 정상조직세포보다 강한 방사선저항성을 나타내는 경우도 드물게 있으나¹⁾, 일반적으로 암세포가 정상조직세포

보다 방사선감수성이 높기 때문에 방사선치료의 의의가 있으며 방사선치료는 주위정상조직의 장해를 최소화시키면서 암세포를 치사시키거나 그 발육을 억제시켜야 한다^{2,3)}.

암세포의 방사선감수성은 일반적으로 암세포의 분화도와 세포주기, 암종의 발육형식과 이의 크기 그리고 암종이 발생된 주위조직의 상황 등에 의하여 영향을 받지만¹⁾, 암세포가 유래된 원래 조직의 방사선감수성에도 크게 의존된다^{1,4)}. 즉 구강악안면부에서 발생하는 악성종양 중 타액선의 선암종과 점막표피양암종은 타액선의 방사선감수성이 중등도 이하이므로 중등도 이하의 방사선감수성을 보이며, 방사선감수성이 중등도 이상인 구강점막에서 유래되는 편평세포암종은 중등도 이상의 방사선감수성을 가진다. 또한 방사선단독치료에 반응을 보인 암환자로부터 치료전 생검하여 얻은 암세포주는 방사선감수성이 높으나 방사선단독치료에 실패한 환자로부터 치료전 생검하여 얻은 암세포주는 방사선감수성이 낮으므로²⁾, 방사선에 내성이 있는 세포들은 방사선치료시 낮은 반응을 보일 것으로 예측할 수 있다.

따라서 암세포의 방사선감수성은 방사선치료의 반응을 보여주는 지표가 될 수 있으므로 이에 대한 실험결과들은 방사선치료환자의 생존율을 예측하는데 이용될 수 있다^{5,6)}.

방사선감수성의 연구로는 인체의 정상세포에

대한 것⁷⁻⁹⁾을 비롯하여 시험관내에서 증식이 가능하고 배양계대주로서 안정성이 지속되는 종양으로부터 분리시킨 암세포주에 대한 연구¹⁰⁻¹³⁾ 등이 있다. HeLa세포를 대상으로 Puck와 Marcus¹⁴⁾는 방사선조사로 인하여 발생하는 세포손상효과를 측정하는 세포생존곡선을 최초로 작성하였으며, 이 곡선이 세포의 방사선감수성 연구에 이용되고 있다. Fertil과 Malaise²⁾, Deacon등³⁾은 2Gy 방사선량에서의 세포생존율 (surviving fraction after 2Gy)을 나타내는 암세포주의 고유방사선감수성은 방사선치료시 암조직의 반응과 높은 상관관계를 가진다고 보고한 바 있으며, 清水谷¹⁰⁾은 사람 구강저암종 KB세포주에 대하여 방사선조사로 얻은 세포생존곡선은 2Gy정도에서 세포생존율이 견(shoulder)부에 해당하여 비교적 방사선감수성이 낮다고 보고한 바 있다. 따라서 일반적으로 세포생존곡선에서 고선량부위에서가 아닌 2Gy의 방사선량에서의 세포생존율이 그 세포의 방사선감수성의 평가 기준이 된다.

한편 방사선치료후 생체정상조직에서 일어나는 반응과 정상세포에 대한 시험관내 실험에서 얻어진 방사선감수성에 대하여, Burnet등¹⁵⁾은 급성반응과, Geara등¹⁶⁾은 만성반응과 각각 많은 관련이 있다고 하였는데 이는 방사선조사후 잔존 DNA 손상과 세포의 생존과 관계된다¹⁷⁾.

조사방사선의 총선량은 암세포의 방사선감수성과 더불어 방사선치료 결과에 많은 영향을 미치는데, 총방사선량은 목적장기 내지 조직의 체적 및 시간요소가 고려되어야 한다¹⁸⁾. 그리고 총방사선량은 주위정상조직의 방사선내성에 의하여 제한됨으로 방사선치료시에는 정상조직의 장해를 최소화시키면서 국소제어율을 증가시킬 수 있는 총선량을 조사하여야 한다¹⁾.

근래 악성종양의 치료시에 외과적 수술후 여러 종류의 항암제가 단독 또는 복합형태로 이용되고 있는데, 각종 항암제는 암세포의 여러 세포의 대사경로에 개입하여 DNA 합성저해, DNA복제, 전사, 단백질합성 등의 차단, 핵산 전구물질의 합성장애, 세포분열장애를 야기하여 세포독성을 나타낸다¹⁹⁾. 암세포의 항암제감수성에 대하여서는 선택

들²⁰⁻²²⁾에 의하여 활발하게 연구 보고되고 있다. Ensley등²³⁾, Taylor등²⁴⁾, Chang²⁵⁾은 두경부 편평세포암종 환자에 있어서 암화학요법과 방사선치료법의 항암효과에 대하여, Carmichael과 Hickson²⁶⁾은 항암제와 X선의 세포내성에 대한 작용기구에 대하여 보고하였으며, Shields등²⁷⁾, Liu²⁸⁾는 수술이 불가능한 폐암환자에서 mitomycin C, vinblastin, cisplatin, vindesine 등을 포함한 복합암화학요법이 비교적 높은 반응을 보였다고 하였고, Al-Sarraf등²⁹⁾, Rooney등³⁰⁾은 중증의 두경부악성종양의 치료에 cisplatin과 5-fluorouracil(5-FU)과 같은 항암제의 복합요법을 보고한 바 있다. 또한 清水谷¹⁰⁾와 Baker등³¹⁾은 각각 사람 구강저암 KB세포주와 사람 암세포주에 대한 방사선과 항암제의 병용효과에 대하여, Shrieve와 Harris³²⁾는 bleomycin과 방사선조사가 정상 및 저산소세포에 미치는 영향에 대하여 각각 연구 보고한 바 있다. 한편 심과 이³³⁾는 사람 종양세포주에 대한 α -인터페론의 시험관내 및 생체내 항암효과에 대하여, 이 등¹⁹⁾은 시험관 및 생체내 암세포에 adriamycin이 미치는 효과에 대하여 연구 보고한 바 있다.

암화학요법에 이용되는 약제 중에 생체에 대한 반응이 대체로 방사선에 의한 반응과 유사한 것들로서는 알킬화제, 대사길항제, 항종양항생물질 등이 있다¹⁾. 항종양항생물질로서는 mitomycin C, bleomycin 등이 있으며 알킬화제로서는 ifosfamide, cisplatin 등이 있다. Bleomycin은 산소성세포에 주로 작용하며 항암효과와 방사선반응 증강효과가 있고³²⁾, cisplatin은 platinum 합성체로서 저산소세포에 대한 방사선의 반응을 증강시키는데, 이를 방사선과 병용할 경우 방사선반응 증강효과가 크다는 사실이 밝혀져 있다^{23,25)}.

각종 항암제의 감수성은 개개의 암세포에 따라 다르므로, 병소를 달리하는 암종이나 동일 조직 내에서 적출한 암세포도 항암제에 대한 감수성이 다르다¹⁹⁾. 따라서 암세포의 항암제에 대한 감수성의 평가는 매우 중요하며 이의 방법도 다양하게 보고되고 있다. 항암제의 감수성에 대한 시험관내 실험법으로서는 dye exclusion 분석법(DEA)

³⁴⁾, human tumor clonogenic 분석법(HTCA)³⁵⁾, bichinchronic acid 분석법(BCA)³⁶⁾, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide 분석법(MTT)^{21,37)} 등이 널리 이용되고 있다.

암세포주에 대한 방사선감수성과 항암제감수성에 대하여서는 선학들의 연구들이 많이 있으나 방사선과 암화학요법의 병용시에 발견되는 암세포치사효과를 평가한 연구가 임상치의학 분야에서는 매우 드물다고 사료된다. 본 연구는 사람 표피양암종 A-253세포주에 방사선 단독조사, 항암제 단독투여, 그리고 방사선조사후 항암제인 bleomycin과 cisplatin을 각각 투여하여 각 실험군에서 세포생존율을 구하고 이들 방사선과 항암제들의 암세포주에 대한 감수성이나 반응을 평가함으로써 두경부 악성종양환자의 치료를 위한 기초자료를 얻는데 그 목적이 있다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 암세포주 및 배양

암세포주는 사람 악하선의 표피양암종으로부터 분리하여 배양계대주화 한 A-253이었으며, 이 세포주를 10%우태아혈청(D-FBS)(MA Bio-products, Walkersville, MD)과 streptomycin과 penicillin이 각각 100 $\mu\text{g/ml}$, 100 units/ml씩 배합된 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute, Gibco, Grand Island, N.Y. USA) 배양액을 사용하여 온도 37°C, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, A-253 세포주를 96well plate에 2×10^4 cells/ml되도록 분주하였다.

2) 방사선조사장치

방사선조사는 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8(Atomic Energy Canada Ltd, Ottawa, Ontario, Canada)을 이용하였다.

3) 항암제

항암제로서는 bleomycin sulfate(Kayaku Co. Japan)와 cisplatin(Bristol-Myers, SAE)을 0.15 M NaCl용액과 혼합하여 사용하였고, 실험기간 중에는 -70°C 냉암소에 보관하였다. 실험에 사용한 bleomycin sulfate와 cisplatin 농도는 각각 2 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며 이를 MTT분석에 적용하였다.

2. 실험방법

1) 방사선조사

A-253 세포주에 ⁶⁰Co Irradiator를 이용하여 실온에서 선량을 210 cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10 Gy를 각각 단회조사하였으며 방사선조사시 SSD는 60 cm, 조사야는 15×20 cm²이었다.

2) 항암제 투여

A-253 세포주에 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 bleomycin과 cisplatin을 각각 단독투여 하였다.

3) 방사선조사 후 항암제 투여

방사선조사 직후 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 bleomycin과 cisplatin이 각각 배합된 배양액에 A-253 세포를 넣어 현탁액을 만들고, 이를 온도 37°C, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂ 배양기에 60분간 정치배양한 후, 동일한 방법으로 2회 원침하여 항암제를 제거하였다. 96 well plate에 RPMI배양액 2 ml를 혼합하고 상기 조건으로 배양기에서 암세포주를 3일간 정치배양한 후 실험에 적합한 세포주의 증식을 확인하였다.

3. 측정방법

세포주는 흡광도를 측정하기 4시간 전에 MTT 5 mg/ml가 혼합된 배양액을 200 $\mu\text{l/well}$ 가 되게 하여 4시간 동안 정치배양하였다. 배양액을 버리고 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 100 $\mu\text{l/well}$ 씩 넣어 15분간 실온에 정치하여 세포 내에 형성된 MTT formazan 산물을 용해한 후, 분광광도계 540nm에서 용해된 MTT의 흡광도를 scanning multiwell spectrophotometer (Enzyme -Linked Immunosorbant Assay Reader : Biotek Instru-

ments, Inc. Burlington, VT)로 측정하여 세포독성의 백분율을 구하였으며 모든 실험은 3선 반복하였다.

III. 실험성적

1. 대조군

A-253 세포주는 분주 후 시험관내의 기저면에 부착하여 빠르게 성장하였다. MTT분석에서

Table 1. Radiation Surviving Fraction of A-253 in MTT assay

Dose(Gy)	Surviving Fraction (Mean ± S.D.)	Ratio (Experimental/Control)
Control	0.75 ± 0.03	1
2	0.70 ± 0.04	0.93
4	0.72 ± 0.04	0.96
6	0.65 ± 0.01	0.87
8	0.60 ± 0.03	0.80
10	0.59 ± 0.01	0.79

No significantly different by ANOVA test(P>0.05)

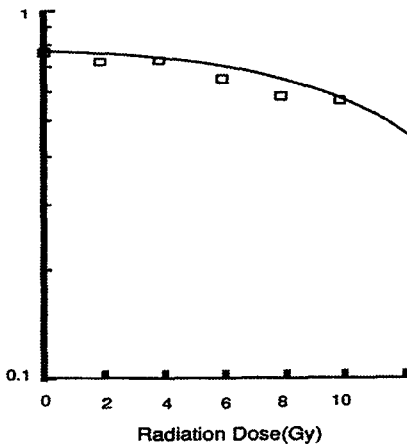


Figure 1. Radiation Surviving Fraction of A-253 in MTT assay.

방사선 단독조사군 또는 항암제 단독투여군의 3일째 A-253 세포주의 최적밀도는 0.75 ± 0.03 (2×10^4 cells/ml) 이었다(Table 1, 2).

2. 실험군

1) 방사선 단독조사군

방사선조사 후 3일째 A-253 세포주는 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 각 조사군에서 대조군에 대한 세포생존율이 0.96~0.79의 범위를 보였고, 방사선량이 증가됨에 따라 세포생존율이 감소되었으며 (Table 1), 완만한 기울기의 세포생존곡선을 나타내었다(Fig. 1).

Table 2. Effect of Antitumor Drugs on A-253 in MTT assay

Drug	Surviving Fraction (Mean ± S.D.)	Ratio (Experimental/Control)
Control	0.75 ± 0.03	1
Bleomycin	0.51 ± 0.08*	0.68
Cisplatin	0.37 ± 0.03*	0.49

* Significant by ANOVA test(P<0.001)

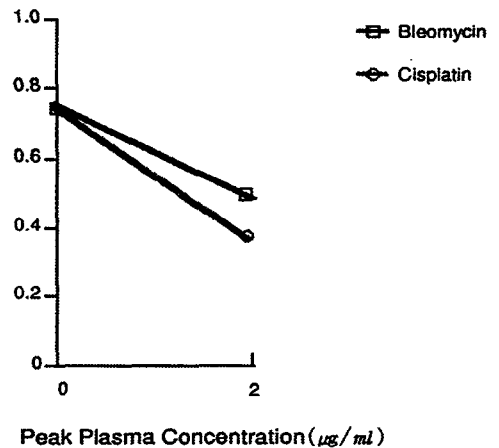


Figure 2. Effect of Antitumor Drugs on A-253 in MTT assay.

Table 3. Effect of Radiation and Antitumor Drugs on A-253 in MTT assay

Radiation dose(Gy)	Radiation only	Radiation + Bleomycin 2 [†]		Radiation + Cisplatin 2 [†]	
	Surviving Fraction (Mean±S.D.)	Surviving Fraction (Mean±S.D.)	Ratio (Experimental/Radiation)	Surviving Fraction (Mean±S.D.)	Ratio (Experimental/Radiation)
2	0.70±0.04	0.41±0.01*	0.59	0.33±0.03*	0.47
4	0.72±0.04	0.45±0.02*	0.63	0.32±0.02*	0.44
6	0.65±0.01	0.44±0.05*	0.68	0.37±0.01*	0.57
8	0.60±0.03	0.38±0.02*	0.63	0.34±0.03*	0.57
10	0.59±0.01	0.38±0.01*	0.64	0.32±0.03*	0.54

2[†]: Peak Plasma Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)

*Significant by ANOVA test ($P < 0.001$)

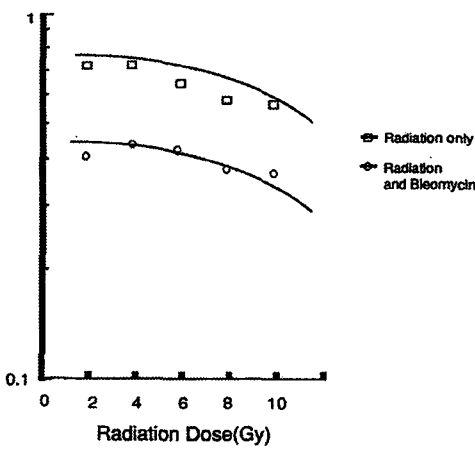


Figure 3. Effect of Radiation and Bleomycin on A-253 in MTT assay.

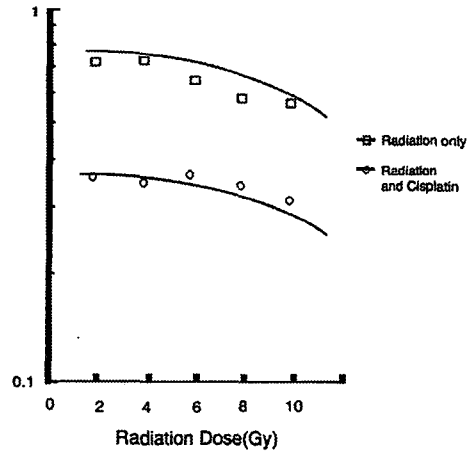


Figure 4. Effect of Radiation and Cisplatin on A-253 in MTT assay.

2) 항암제 단독투여군

A-253 세포주에 bleomycin과 cisplatin을 각각 단독투여한 경우, 대조군에 대한 세포생존율이 각각 0.68, 0.49로 감소되었다(Table 2, $P < 0.001$). 그러나 bleomycin과 cisplatin 간의 유의한 세포독성효과의 차이는 없었다(Fig. 2).

3) 방사선조사 후 항암제투여군

A-253 세포주에 방사선조사와 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 bl-

eomycin투여를 병용한 경우, 방사선 단독조사군에 대한 세포생존율이 0.59~0.68의 범위를 보였고, 방사선을 단독조사한 경우와 비교하여 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었다(Table 3, Fig. 3, $p < 0.001$). 또한 A-253 세포주에 방사선조사와 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cisplatin투여를 병용한 경우, 방사선 단독조사군에 대한 세포생존율이 0.44~0.57의 범위를 보였고, 방사선을 단독조사한 경우와 비교하여 2, 4,

6, 8, 10 Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었다(Table 3, Fig. 4, $P < 0.001$). 그러나 방사선조사와 2 μ g/ml의 bleomycin 또는 방사선조사와 cisplatin투여를 병용한 경우, 두 군 사이에서는 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 모든 방사선량에서 세포생존율의 차이가 인정되지 않았다(Table 3, $p > 0.05$).

IV. 총괄 및 고안

각종 암환자의 치료시에 환자 개개인의 치료 결과를 예측할 수 있는 방법⁹⁾들은 많지만 아직 미흡하므로, 치료 전에 이의 결과를 예측하고 치료결과를 향상시키기 위하여서는 암세포의 방사선감수성이나 항암제감수성을 미리 평가하는 것이 필요하다²⁹⁾.

최근 종양으로부터 분리한 세포를 원종양의 숙주와 동일계의 동물에 이식하여 종양세포의 배양주를 얻기 위한 많은 연구의 결과로 분리된 세포주의 수와 종류가 많아졌으며, 배양계대한 암세포주의 방사선 또는 항암제에 의한 세포치사효과에 관하여 많은 연구^{6,11,19,33)}가 보고되고 있다. 배양계대주를 이용한 암세포의 방사선과 항암제에 의한 치사효과의 평가에는 이들 방사선량과 항암제농도에 따른 세포생존곡선이 이용되고 있는바 세포생존곡선의 형을 나타내는 데에는, 통상 세포감수성의 지표가 되는 D_0 , 준치사장해로부터 회복능력을 나타내는 D_q , 외삼수를 나타내는 n 등 3가지의 매개변수가 이용된다^{10,14,38)}. Fertil과 Malaise²⁾는 2Gy의 방사선량에서의 암세포생존율은 개개인의 암종이 가지고 있는 클론형성세포 고유의 방사선감수성에 의존하므로, 이는 암세포의 방사선에 대한 감수성을 결정하는 기준이 되고 치료결과를 예측하는 수단이 된다고 하였다. Brock등³⁹⁾은 두경부 편평세포암종환자에서 방사선치료 전 생검조직으로부터 1차 배양한 세포에서 2Gy 방사선량에서의 세포생존율을 얻은 후 이것과 치료결과와의 상관관계를 분석한 결과, 0.11로부터 0.91까지의 범위로서 평균 0.33이었으며 0.4이상인 경우에는 0.3이하인 경우보다 재발의 위험도가 높다고 하였고,

고 등⁴⁰⁾은 사람 후구치삼각부 편평세포암종 세포주에서 2Gy 방사선량에서의 세포생존율이 0.185로서 두경부의 편평세포암종 세포주의 방사선 감수성이 타부위의 편평세포암종보다 다소 높으며 편평세포암종 세포주는 방사선에 대한 다양한 감수성을 보인다고 보고하였다.

또한 Peacock등¹²⁾, Puck와 Marcus¹⁴⁾, Hall등⁴¹⁾은 세포생존곡선에서 그 기울기가 방사선감수성의 정도를 나타내며 기울기가 클수록 방사선감수성이 높다고 하였다. 따라서 방사선치료에 대한 임상적 반응정도를 결정하는 중요한 요인인 방사선감수성을 치료 전에 예측해야 할 필요성이 높으며 이의 기본이 되는 세포생존곡선의 기울기로 암환자의 치료가능성 여부를 평가할 수 있다고 생각된다.

본 연구에서 A-253 세포주에 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 방사선량을 각각 단회조사할때, 대조군에 대한 세포생존율이 0.96~0.79로서 세포생존곡선은 완만한 기울기를 나타내었고 방사선량이 증가됨에 따라 생존율이 감소되는 경향을 보였으나 모든 선량군에서 대조군과의 세포생존율의 차이는 인정되지 않았다. 따라서 A-253 세포주의 방사선감수성은 낮은 것으로 사료되는 바 이러한 본 연구결과는 점막표피양암종의 방사선감수성이 중등도이하군에 속한다는 선택들^{1,4)}의 연구결과와도 상이하지 않다.

방사선에 의한 세포사는 대부분 분열사로서, 방사선은 DNA에 주로 작용하여 DNA의 단일 또는 이중가닥의 절단, DNA염기 배열의 변화 및 손실 등을 일으키므로 손상세포는 세포분열을 지속하지 못하여 세포사에 이르게 된다. 또한 방사선을 조사받은 세포에서는 세포분열의 지연, DNA합성저해, G_2 기 세포들의 증가가 일어나지만 손상으로부터 회복된 세포는 다시 분열기로 이행하며 방사선에 의하여 세포는 치사, 준치사 손상을 일으키는데 준치사손상으로부터의 회복은 대체로 2~4시간이 소요된다⁴²⁾.

방사선조사후에 손상으로부터 회복되는 능력과 속도는 조직과 세포주의 종류에 따라 다르다고 알려져 있다. Regaud⁴³⁾는 세포나 조직의 이러한 손상으로부터의 회복능력과 방사선감수성

과의 관계에 대하여 방사선에 의한 손상 후 전혀 회복이 이루어지지 않기 때문에 방사선에 대한 감수성이 높은 경우가 있다고 하였으며, 고 등⁴⁰⁾은 세포의 방사선감수성이 손상회복에 크게 영향을 미치는데 손상회복이 증진되어 방사선감수성이 낮아지면 손상회복억제방법에 의해 방사선감수성을 변화시킬 수 있다고 하였다. Wurm 등¹⁷⁾은 사람 섬유모세포주에 방사선을 조사한 경우, 초기 손상과 세포생존과는 관계가 없으나 회복시간이 경과된 후에 잔존되는 DNA손상의 양과 세포생존과는 상관관계가 크므로 DNA손상을 분석하면 방사선에 대한 정상조직의 반응을 예측할 수 있다고 보고한 바 있다.

총방사선량을 조사하는 경우에, 암세포의 치사효과를 증가시키는 반면에 주위정상조직을 주로 준치사적 손상으로부터 회복시킬 목적으로 통상 분할조사법이 이용되고 있다. 현재 분할조사법의 변형으로서 과분할조사법(hyperfractionation), 가속분할조사법(accelerated fractionation), 가속과분할조사법(accelerated hyperfractionation)이 연구 고안되고 있다⁴⁴⁾. 그러나 단회 조사시와는 달리 분할조사에서는 회복, 재분포, 재군집화, 재산산화 등의 세포동태학적 인자⁴⁵⁾가 고려되어야 한다.

본 실험에서는 사람 표피양암종 A-253 세포주에 방사선을 단회조사하였으며, 단회조사와 분할조사시의 방사선감수성의 차이에 대해서는 향후 총방사선량을 단회 또는 분할조사한 후 37%의 세포생존율을 나타내는 평균치사량을 비교하여야 할 것으로 사료된다.

암환자 치료에 있어서 근래에는 암화학요법이나 방사선과 항암제의 병용요법이 활발하게 이용되고 있는데, 암세포의 항암제감수성은 암환자 치료결과에 많은 영향을 미친다. 두경부 암치료에는 항암제 중에서 bleomycin, cisplatin, methotrexate, mitomycin C가 효과적으로 적용되고 있다^{46,47)}.

Schroyens 등²²⁾은 두경부암의 항암제감수성에 대한 시험관내 실험과 생체내 암화학요법의 결과에서 cisplatin과 methotrexate는 높은 상관관계를 보였으나 bleomycin은 일부 암세포에 대하

여 상관관계가 낮다고 보고한 바 있다. Bleomycin은 수용성 당펩타이드로서 방사선에 대한 증강작용이 있어 구강영역의 편평세포암종에 높은 치료효과가 있다고 보고⁴⁸⁾된 바 있다. Bleomycin의 암세포에 대한 작용기구는 산소성세포에 주로 작용하여 DNA합성저해와 DNA가닥의 절단을 야기하는것으로 알려져 있으며 세포주기로는 G₂~M기에 가장 감수성이 높다고 加藤 등⁴⁹⁾이 보고하였다.

한편 cisplatin은 1969년에 처음으로 실험종양에서 항암효과가 입증된 이후⁵⁰⁾, 암화학요법에 광범위하게 사용되는 항암제의 하나이다. Cisplatin의 암세포에 대한 작용기구는 아직 불명하지만, 이는 암세포의 DNA합성을 저해하고 DNA가닥 사이에 가교를 형성함으로써 저산소세포의 방사선감수성을 높여주며, 세포주기 중 G₁기로부터 S기로의 이행을 방해한다고 알려져 있다⁵¹⁾. 또한 cisplatin 투여로 인하여 정상조직에는 비교적 경미한 영향이 발현된다고 알려져 있으나 구토, 오심 등의 위장관 불내성, 신부전 등의 급성부작용이나 피부, 골수에 경도의 장해를 유발시키기도 한다⁵²⁾.

본 연구에서도 A-253세포주에 대한 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여한 경우 대조군과의 세포생존율의 차이가 인정되었다. 그러나 bleomycin과 cisplatin의 세포독성효과의 차이는 인정되지 않았다.

항암제 투여방법의 선택은 암환자치료의 효율성과 치료에 대한 내성을 결정하는데 중요하다. Andreasson 등⁵³⁾은 중증 두경부암 치료에 mitomycin C와 bleomycin의 복합암화학요법을 시행하였고, Ensley 등²³⁾은 두경부 편평세포암종환자의 복합암화학요법시에, 암화학요법에 반응을 보이는 환자에서는 방사선치료의 반응이 크게 발현되지만 초기 암화학요법에 반응을 보이지 않은 환자에서는 추후의 방사선치료에도 거의 반응을 나타내지 않는다고 하였다.

한편 각종 악성종양 치료시 방사선 단독치료보다는 항암제와의 병용요법이 현저한 항암효과를 보인다^{32,54)}는 사실은 잘 알려져 있으며, 두경부 악성종양은 치료 후의 기능 및 심미의 유지를

위하여 이 병용요법이 근래 많이 이용되고 있다. Bono등⁵⁵⁾은 배양세포와 생체내 세포에서 bleomycin과 X선과의 병용요법을 시행하여 치료의 상승효과를 밝혀낸 바 있다.

眞崎⁴⁸⁾는 구강편평세포암종을 bleomycin과 방사선으로 병용치료하면 30Gy의 저방사선량으로 치료가 가능하다고 하였으며, 清水谷등⁵⁶⁾은 30Gy의 방사선과 90mg의 bleomycin을 병용하여 치료하면 T1, T2의 초기암은 높은 반응을 보이고 T3의 진행암의 경우에도 높은 반응과 국소제어가 가능하다고 하였다. 그리고 cisplatin 투여의 경우에도 방사선 반응의 증강효과가 있으며⁵⁷⁾ 원격전이의 가능성을 감소시켜 환자생존율을 향상시킨다고 알려져 있다⁵⁸⁾.

Al-Sarraf등²⁹⁾은 암화학요법에 실패한 두경부 진행암의 경우 cisplatin과 방사선으로 병용치료를 할 때에 좋은 치료결과가 있었다고 하였고, Britten등⁵⁹⁾은 cisplatin과 방사선조사를 병용하면 cisplatin의 세포독성효과에 의하여 높은 국소제어율을 보이는데, 병용요법을 시행할 경우 cisplatin의 총투여량을 증가시키는 것이 방사선의 분할조사량을 증가시키는 것보다 국소제어율을 향상시킨다고 보고하였다.

또한 Murthy등⁶⁰⁾은 44례의 두경부 수술불능, 재발암에 대하여 cisplatin, multidrug resistance가 없는 5-Fu⁶¹⁾와 방사선조사를 병용한 결과 2년후 87%의 국소제어율을 보여, 이 치료법이 국소제어율을 더욱 상승시킬 수 있음을 보고하였다.

본 연구에서도 A-253 세포주에 방사선을 단독조사한 경우보다 방사선과 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 경우에 세포독성효과가 크게 나타났다. 이러한 결과는 bleomycin은 G₂ block을 야기시키고 cisplatin은 G₁기에서 S기로의 이행을 방해하므로 방사선조사 후에 일어나는 준치사손상세포의 회복이 방해되기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 방사선조사와 bleomycin을 병용한 경우와 방사선조사와 cisplatin을 병용한 경우 양자사이에서는 세포생존율의 차이가 없었다.

한편 암환자 치료시 방사선조사와 항암제투여

요법을 병용하는 경우, 항암제 투여 후에 방사선을 조사하면 암세포의 치사효과가 높다고 알려져 있는데, 増田등⁶²⁾은 bleomycin과 X선의 병용실험에서, 清水谷등⁵⁶⁾은 bleomycin의 유도체인 pepleomycin과 X선과의 병용실험에서 각각 X선 조사전에 bleomycin 또는 pepleomycin을 투여하였을 때 암세포주의 치사효과가 다소 컸다고 하였으며, Lelieveld등⁶³⁾은 방사선조사 전에 cisplatin을 투여하였을 때 항암효과가 크고 부가적인 치료효과의 향상이 있는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 A-253 세포주에 방사선조사 직후 bleomycin과 cisplatin을 각각 투여하였다. 따라서 이들 항암제의 방사선 증강효과 또는 부가효과를 평가할 수는 없었으며 향후 방사선조사 전, 후의 암세포의 치사효과에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

암세포의 항암제감수성의 평가방법은 다양하지만, MTT분석법은 단기간의 세포독성측정에 유용하며, 실험결과의 객관성 및 재현성이 우수하다고 알려져 있어^{21,64,65)} 본 연구에서는 MTT 분석법을 이용하였는데 formazan 산물의 용해성이 낮으므로 이의 용해성을 높이기 위하여 DMSO를 사용하였으며 세포내에 형성된 MTT formazan 산물을 용해하여 분광광도계 540nm에서 용해된 흡광도를 측정하였다. 그러나 MTT 분석법의 임상적용을 위해서는 보다 정확하면서도 간편하고 신속한 분석법의 개발이 요구된다고 사료된다.

본 연구는 사람 표피양암종 A-253 세포주에 대하여 방사선 단독조사, 항암제 단독투여 및 방사선조사후 항암제를 투여하여 암세포주의 생존율을 평가하였다. 향후 보다 많은 연구를 통하여 방사선 증강효과를 높일 수 있으며 multidrug resistance 성질이 있는 암세포의 특성 등이 구명되어 새로운 항암제가 개발되어야 할 것이며, 다양한 방사선 분할조사가 세포독성에 미치는 영향도 구명되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

사람 표피양암종 A-253 세포주에 대한 방사선 및 항암제의 세포독성반응을 알아보기 위하여 방사선 단독조사군에는 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 방사선을 각각 단회조사하였으며, 항암제 단독투여군에는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여하였다. 또한 방사선조사와 항암제를 병용한 경우에는 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 방사선을 각각 단회조사한 직후 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 투여하였다. 이들 실험군에서 세포생존율을 구하고 세포생존곡선들을 작성한 후 세포독성반응을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. A-253 세포주에 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 방사선을 각각 단회조사한 경우 세포생존곡선은 완만한 기울기를 나타내었다.
2. A-253 세포주에 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여한 경우 대조군과의 세포생존율의 차이가 인정되었다. 그러나 bleomycin과 cisplatin의 세포독성효과의 차이는 인정되지 않았다.
3. A-253 세포주에 방사선을 단회조사한 경우와 방사선조사와 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 bleomycin투여를 병용한 경우, 두 군사이에서는 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 나타내었다.
4. A-253 세포주에 방사선을 단회조사한 경우와 방사선조사와 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cisplatin투여를 병용한 경우, 두 군 사이에서는 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 나타내었다.
5. 방사선조사와 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 bleomycin 또는 방사선조사와 cisplatin투여를 병용한 경우, 두 군 사이에서는 2, 4, 6, 8, 10 Gy의 모든 방사선량에서 세포생존율의 차이가 인정되지 않았다.

REFERENCES

1. 足立忠 : 放射線學(臨床編), 第7版, 醫學書院, 1977,

pp. 289-292.

2. Fertil B, Malaise EP : Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7:621-629, 1981.
3. Deacon J, Peckham MJ, Steel GG : The radioresponsiveness of human tumors and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 2:317-323, 1984.
4. 日本アイソトープ協會 : 核醫學入門, 第1版, 丸善株式會社, 1978, pp. 77-95.
5. Friedman M : Aspects of radiation biology and radiation pathology observed during the treatment of cancer in man. *Brit J Radiol* 48:81-96, 1975.
6. Weichselbaum RR, Epstein, J, Little JB : In vitro cellular radiosensitivity of human malignant tumors. *Europ J Cancer* 12:47-51, 1976.
7. Arlett CF, Harcourt SA : Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Research*, 40:926-932, 1980.
8. Malaise EP, Deschavanne PJ, Fertil B : The relationship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells. *Int J Radiat Biol*, 56(5):597-604, 1989.
9. Peters LJ : Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cell as a predictor of human tumor response. *Radiotherapy and Oncology* 17:177-190, 1990.
10. 清水谷 公成 : ヒト口腔底癌由末 KB細胞におけるX線とベブレオマイシンの併用効果. 齒放, 25:232-238, 1986.
11. 横田 昌彦 : マウス線維(NFSa)分離培養株細胞(Y-83)の放射線感受性に關する研究. 齒放, 26:108-115, 1986.
12. Peacock JH, Eady JJ, Edwards S, et al : Initial damage or repair as the major determinant of cellular radiosensitivity?. *Int J Radiat Biol* 56(5):543-547, 1989.
13. Stuschke M, Budach V, Stüben G, Streffer C, et al : Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines : Studies in a three-dimensional model system. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 32(2):395-408, 1995.
14. Puck TT, Marcus PL : Action of X-rays on mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 103:653-667, 1956.
15. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH : Prediction of normal

- tissue tolerance to radiotherapy from in vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339:1570-1571, 1992.
16. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA : 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.
 17. Wurm R, Burnet NG, Duggal N, Yarnold JR, Peacock JH : Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *Int J Radiat. Oncol Biol Phys*, 30:625-633, 1994.
 18. Fowler JF, Stern BE: dose-rate effects; some theoretical and practical consideration. *Brit J Radiol* 33:389-395, 1960.
 19. 이창해, 이봉기, 이원영, 김주덕 : 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 Adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성. *연세의대논문집*, 16(1): 180-192, 1983.
 20. Rozenzweig M, Dodion P, Bruntsch U, Gallmeier, W, Clavel M, Gignoux B, et al : Combination chemotherapy with cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristin(CABO) in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 54:1499-1503, 1984.
 21. Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE, et al : Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer* 57 : 540-547, 1988.
 22. Schroyens W, Tueni E, Dodion P, Bodeckee R, Stoessel F, 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.
 23. Ensley JF, Jacobs JR, Weaver A : Correlation between response to cisplatin combination chemotherapy and subsequent radiotherapy in previously untreated patients with advanced squamous cell cancers of the head and neck. *Cancer*, 54:811-814, 1984.
 24. Taylor SG 4th, Applebaum E, Showel JL, Norusis M, Holinger LD, Hutchinson JC Jr, et al : A randomized trial of adjuvant chemotherapy in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.*, 3:672-679, 1985.
 25. Chang H : Radiosensitization of cis-platinum in the treatment of advanced head and neck squamous cell carcinoma. *J Korean Soc Ther Radiol.*, 10(1):27-34, 1992.
 26. Carmichael J, Hickson ID : Keynote address : Mechanisms of cellular resistance to cytotoxic drugs and X-irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20:197-202, 1991.
 27. Shields TW, Higgins GA Jr, Humphrey EW, Matthews MJ, Keehn RJ : Prolonged intermittent adjuvant chemotherapy with CCNU and hydroxyurea after resection of carcinoma of the lung. *Cancer*, 50:1713-1721, 1982.
 28. Liu RP : Chemotherapy outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *Semin Oncol* 20 : 296-301, 1993.
 29. Al-sarraf M, Pajak TF, Cooper JS, Mohiuddin M, Herskovic A, Age PJ : Chemoradiotherapy in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma : A radiation therapy oncology group study. *J. Clin. Oncol.*, 8:1342-1351, 1990.
 30. Rooney M, Kish J, Jacobs J, Kinzie J, Weaver A, Crissman J, et al : 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.
 31. Baker FL, Spitzer G, Ajani JA, Brock WA, Luke-man J, Pathak S, et al : Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor using cell adhesive matrix and supplemented medium. *Cancer Res* 46:1263-1274, 1986.
 32. Shrieve DC, Harris JW : Effects of bleomycin and irradiation on euoxic and hypoxic cells. *Int J Radiat Oncol Biol. Phys* 5:1495-1498, 1979.
 33. 심우남, 이원영 : 사람종양 세포주에 대한 rHu IFN- α A의 시험관내 및 생체내 항암효과. *대한면역학회지*, 9:249-257, 1987.
 34. Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso, CK : A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res*, 43:749-757, 1983.
 35. Hamburger AW, Salmon SE : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197:461-463, 1977.
 36. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Annals Biochem* 150:76-85, 1985.
 37. Sasaki F, Ishimura H, Takada N, Uchino J : Chemosensitivity test for thyroid cancer by in vitro

- MTT assay. *Gan. To. Kagaku Ryoho* 22:1771-1781, 1995.
38. 坂本澄彦 : 癌の放射線生物學, 第1版, 中外醫學社, 1978, pp. 26-58.
 39. Brock WA, Baker FL, Wike JL, Sivon SL, Peters LJ : Cellular radiosensitivity of primary head and neck squamous cell carcinomas and local tumor control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18:1283-1286, 1990.
 40. 고경환, 하성환, 박찬일 : 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구. *대한치료방사선학회지*, 11(1):17-27, 1993.
 41. Hall EJ, Marchese MJ, Astor MB, 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.
 42. Tsinga E, Casarett GW : Mitochondria and radiation sensitivity of cells. U.S. Atomic energy emission report, UR-666, 1965.
 43. Regaud C : The influence of the duration on the changes produced in the testis by radium. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 86:782-789, 1922.
 44. Fletcher GH : Textbook of radiotherapy. Lea and Febiger, 1980, pp. 105-175.
 45. Anna K, Speke M, Richard P : Repopulation kinetics during fractionated irradiation and the relationship to the potential doubling time. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:847-856, 1995.
 46. Muggia FM, Rozenzweig M, Louie AE : Role of chemotherapy in head and neck cancer; Systemic use of single agents and combinations in advanced disease. *Head Neck Surg.*, 2:196-205, 1980.
 47. Ginsberg RJ, Kris MG, Armstrong JG : Cancer of the lung. In: DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., eds. Principles and practice of oncology, Lippincott Co., 5th ed., Philadelphia, PA, 1993, pp. 673-723.
 48. 眞崎規江 : 口腔扁平上皮癌の放射線治療におけるブレオマイシン併用の役割. *癌と化學療法*, 13:1725-1730, 1986.
 49. 加藤武俊, 水谷峰子, 太田和雄 : Pepleomycin의 連續投與法による抗癌効果. *癌と化學療法*, 10:763-767, 1983.
 50. 강승희, 서현숙, 양광모, 이웅수, 박성관 : 국소적으로 진행된 자궁경부암에서 방사선과 cisplatin의 동시병합요법의 치료결과. *J. Korean Soc. Ther. Radiol.*, 13(1):55-61, 1995.
 51. 김문중 : 암화학적요법. 서광의학서립, 1991, pp. 43-48.
 52. Choo YC, Choy TK, Wong LC, Ma HK : Potentiation of radiotherapy by cis-dichlorodiamine platinum(II) in advanced cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 23:94-100, 1986.
 53. Andreasson L, Björklund A, Mercke C, Scheike O, Andersson T, Brismar J, et al : Intra-arterial Mitomycin C and intravenous bleomycin as induction chemotherapy in advanced head and neck cancer-A phase II study. *Radiother Oncol* 7:37-45, 1986.
 54. Roizin-Towle L, Hall EJ : The effect of bleomycin on aerated and hypoxic in vitro, in combination with irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5:1491-1494, 1979.
 55. Bono VH Jr, Byfield JE, Hagemann RF, Leshner, SH, Valeriote FA, Teresa V : Cell survival systems for the evaluation of irradiation and drug combinations. *Cancer Chemotherapy Reports II*, 5:205-213, 1975.
 56. 清水谷公成, 林靖久, 坂本健吾 등 : 下顎齒肉癌におけるbleomycin/peplomycin併用による放射線治療成績. *齒放*, 29:252-258, 1989.
 57. Kim JC, Park IK : Comparison of the result of radiation alone and chemoradiation in cervical cancer. *J Korean Soc Ther Radiol.* 13(2):191-198, 1995.
 58. 김재성, 박승호, 조문준, 윤완희, 배진선, 정현용 등 : 국소진행된 직장암에서의 수술전 방사선치료 단독군과 방사선치료와 항암제 병용치료군의 치료성적. *J. Korean Soc. Ther. Radiol.*, 13(1):33-39, 1995.
 59. Britten RA, Evans AJ, Allalunis-Turner MJ, Pearcey RG : Effect of cisplatin on the clinically relevant radiosensitivity of human cervical carcinoma cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 34:367-374, 1996.
 60. Murthy AK, Taylor SG. 4th, Showel J, Caldarelli, DD, Hutchinson JC Jr, Holinger LD, et al : Integration of chemotherapy into the combined modality therapy of head and neck squamous cancer. *Int. J Radiat Oncol Biol Phys*, 13:1807-1813, 1987.
 61. 이경영, 박재갑, 아디가즈다, 로리 폴드스타인, 황이숙, 김진복 : 인체 암세포주의 MDR1 유전자 발현도와 항암제 감수성에 관한 연구. *J of Korean Cancer Association* 22(1):37-47, 1990.
 62. 増田康治, 高木東介, 脇坂信一郎 : X線とブレチマイシンの併用療法に關する基礎的檢討, *日本醫放會誌*, 42:691-700, 1982.
 63. Lelieveld P, Scoles MA, Brown JM, Kallman RF : The effect of treatment in fractionated schedules with the combination of X-irradiation and six

- cytotoxic drugs on the RIF-1 tumor. *Int J Radiat. Oncol. Biol Phys.*, 11:111-121, 1985.
64. Campling BG, Pym J, Galbraith PR, Cole SPC : Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemia Research* 12: 823-831, 1988.
65. Klumper E, Pieters R, Kaspers GJ, Huismans DR, Loonen AH, Rottier MM, et al : In vitro chemosensitivity assessed with the MTT assay in childhood acute non-lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 9:1864-1869, 1995.

- ABSTRACT -

A STUDY ON THE RADIOSENSITIVITY AND CHEMOSENSITIVITY OF A-253 CELL LINE IN VITRO

Joo-Hyun Lee, Eui-Hwan Hwang, Sang-Rae Lee

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee 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 human epidermoid carcinoma A-253 cell line using semiautomated MTT assay.

2, 4, 6, 8, 10 Gy were irradiated at a dose rate of 210 cGy/min using ^{60}Co Irradiator ALDORADO 8. After irradiation, A-253 cell lines (2×10^4 cells/ml) were exposed to bleomycin or cisplatin for 1 hour. The viable cells were determined for each radiation dose with/without 2 $\mu\text{g/ml}$ of drug at the 3rd day. And they were compared to control values.

The results were obtained as follows :

1. The surviving curve with gentle slope was obtained after irradiation of 2, 4, 6, 8, 10 Gy on A-253 cell line.
2. The cytotoxicity of bleomycin or cisplatin at the concentration of 2 $\mu\text{g/ml}$ was great on A-253 cell line. But, there was no significant difference between the cytotoxicity of bleomycin and that of cisplatin.
3. There were significant differences of surviving fractions after irradiation with 2 $\mu\text{g/ml}$ of bleomycin compared with irradiation only on A-253 cell line.
4. There were significant differences of surviving fractions after irradiation with 2 $\mu\text{g/ml}$ of cisplatin compared with irradiation only on A-253 cell line.
5. There were no significant differences of surviving fractions between the groups of irradiation with bleomycin and the groups of irradiation with cisplatin on A-253 cell line.