

수종의 암세포주와 섬유모세포주에서 taxol과 전리방사선이 세포독성과 prostaglandin생성에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실

*서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실 및 치학연구소

이건일 · 유동수*

목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 방법
- III. 연구성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

I. 서 론

많은 경우에 암치료를 위하여 화학요법과 방사선요법이 동시에 이용되고 있다. 암치료를 위한 화학요법 및 방사선요법 병행치료의 주된 목적은 치료실패의 원인중의 하나로서 방사선에 대한 저항성이 문제가 될 때 이를 극복하고 전반적인 실패원인인 전이를 방지하고자 하는 것이다. 이런 목적에 사용될 수 있는 이상적인 약제는 강한 세포독성을 가지고 있어야 하고 방사선에 저항성을 갖는 암세포의 방사선감수성을 증강시켜 전리방사선에 의한 암세포의 치사율

을 높일 수 있어야 한다. Taxol은 이러한 점에서 가장 효과적인 약제의 하나이며 이미 임상적으로도 진행된 고형암에 대해 강한 항암효과를 보이는 것으로 밝혀졌다^{1, 2, 3)}.

Taxol은 서양주목나무(*Taxus brevifolia*)의 껍질에서 추출된 물질로서^{4, 5)} 1960년대 후반에 쥐의 여러 암세포에서 정제가 덜된 서양주목나무 추출액이 세포독성이 있다는 가능성이 제기되었으며 그 추출액의 주된 약효성분이 taxol이라는 것이 밝혀졌다⁶⁾.

Schiff 등^{7, 8)}은 taxol이 세포내의 micro-tubule의 집합을 촉진하고 이들을 안정시켜서 세포분열을 정지시킨다고 하였으며 특히 세포분열 중인 세포에서 복제된 염색체가 적절히 분리되거나 세포질이 분열되는 것을 지연시키거나 차단하여 가장 심각한 영향을 주는 것으로 알려졌다^{3, 9, 10)}. Taxol의 농도와 처리시간에 따라 감수성이 높은 세포들은 apoptosis나 괴사에 의해 죽고 다른 세포들은 분열주기로 다시 들어서거나 정상적으로 분열을 완성한다⁹⁻¹³⁾. Taxol은 세포분열에 강한 영향을 주므로 급속히 분열하는 암세포와 정상적으로 분열속도가 빠른 골수, 구강점막, 소화기 점막 및 모낭 등이 주로 영향을 받는다^{1, 2, 3, 14)}.

1992년에 Tishler 등¹⁵⁾은 처음으로 taxol이 세포주기 중 방사선에 대해 가장 예민한 시기에

*이 논문은 1994년도 서울대학교병원 지정연구비(02-94-239) 지원에 의해 이루어진 것임.
접수일:1998년 1월 12일
채택일:1998년 1월 22일

세포를 머물게 하여 세포주기에 특이성을 갖는 방사선증감제로서 작용할 수 있다는 가설을 세우고 인간의 성세포종에서 분리해 낸 G18 세포주를 이용하여 실험을 한 결과 taxol은 분열 중인 세포를 G2기와 M기에 머물게 하며 방사선조사와 병행처리시 세포의 생존율은 처리농도와 처리시간에 의하여 감소한다는 결론을 내렸다. 그 후 여러 학자들이 인간과 쥐의 세포에서 taxol의 방사선감수성 증강능력을 연구하여 비슷한 결과를 보고하였다.¹⁶⁻²²⁾

Prostaglandin E₂(PGE₂)와 prostaglandin F_{2α}(PGF_{2α})를 투여함으로써 생체내에서 방사선에 의한 급성 위장관염 증상이 발현될 수 있다는 보고 이후로 arachidonic acid의 대사체가 이러한 증상의 원인인자일 가능성이 제기되었다.²³⁻²⁶⁾ Eisen 등²⁷⁾은 방사선이 조사된 쥐의 소장과 비장에서 15-hydroxy-prostaglandin dehydro-genase(PGDH)의 활성도가 감소되었다고 하였으며 Borowska 등²⁸⁾은 방사선이 조사된 쥐에서 prostaglandin의 혈장 농도가 소장의 과활동성과 직접관계가 있음을 보고하였다. 특히 Tanner 등²⁹⁾은 두경부 방사선치료후 환자의 혈장에서 prostaglandin의 증가를 발견하여 구내점막염과 prostaglandin의 혈장농도 증가 사이에 긴밀한 관계가 있음을 보고하였다.

국내에서도 방사선감수성에 대한 연구가 활발하여 김과 고³⁰⁾는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide)를 이용하여 여러 암세포주의 방사선감수성을 연구하였고 고 등³¹⁾은 인간과 쥐에서 수종의 암세포주의 저선량 방사선감수성에 대하여 연구하였으며 이와 유³²⁾는 수종의 암세포주와 치은 섬유아세포에서 방사선의 양과 분할조사에 따른 세포활성도와 독성의 변화에 관하여 연구하였다. 그러나 국내에서의 taxol에 관한 연구는 아직 활발하지 않은 상태이며 특히 taxol의 방사선 증감효과와 taxol과 방사선에 의한 prostaglandin생성 변화에 관한 연구는 거의 찾아보기 힘들었다.

이에 저자는 4가지 세포주 KB, RPMI-2650, SW-13 및 L929를 이용하여 taxol의 세포독성, taxol에 의한 전리방사선의 세포독성 변화와 방사선과 taxol에 의해 손상 받은 세포에서의

prostaglandin 생성변화를 관찰하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포의 준비

본 실험에서는 한국세포주은행에서 분양받은 3종의 인체 암세포주와 1종의 생쥐 섬유모세포주를 이용하였다. 각 세포주는 인체의 구강내 유포 피암종에서 얻어진 KB(ATCC No. CCL17), 인체의 비중격에서 발생한 분화도가 낮은 편평상피암으로부터 얻어진 RPMI-2650(ATCC No. CCL30), 인체의 부신피질에서 발생한 선암으로부터 얻어진 SW-13(ATCC No. CCL105) 및 생쥐의 정상 섬유모세포인 L929(ATCC No. CCL17)로서 각각 Eagle's salt가 포함된 Eagle's minimal essential medium에서 배양하였다. 배지에 10%(vol/vol) fetal calf serum, 2mM L-glutamine, sodium bicarbonate 2.2mg/L, streptomycin 50μg, 100 IU penicillin/mL을 첨가하여 5회 내지 7회 계대하여 실험에 사용하였으며 배양배지는 실험하기 3일전과 하루 전에 각각 교환하였다.

2. Taxol의 준비 및 처리

Taxol(NSC 125973, National Cancer Institute drug program, Bethesda, MD)은 dimethyl sulfoxide에 용해하여 농도 1mM의 상태로 냉동보관하였으며 실험전 원하는 농도로 만들어 사용하였다. 각각의 세포를 25cm² flask에서 배양하여 37°C에서 24시간동안 5, 50, 100, 200, 300, 500nM의 taxol로 처리하였다. 대조군으로는 어떠한 처리도 하지 않은 상태의 각 세포주를 이용하였다.

3. 전리방사선 조사

각각의 세포를 방사선조사 72시간 전에 25cm² flask에 1x10⁵개의 상태로 분주하였다. 방사선조사만 하는 세포군은 방사선조사 24시간 전에 배지를 교환해 주었으며, taxol 처리후의 방사

선조사 효과를 보기 위한 세포군은 37°C에서 24시간 동안 500nM의 taxol로 처리하였다. 방사선조사는 linear accelerator (Mitsubishi, 6 MV, Japan)를 사용하여 총 10Gy를 단일 조사하였다. 대조군으로는 어떠한 처리도 하지 않은 상태의 각 세포주를 이용하였다.

4. MTT를 이용한 세포생존율 측정

세포독성은 MTT를 이용한 세포생존율로 측정하였다. 성장배지가 든 25cm² flask의 배양액을 제거하고 인산완충용액(pH 7.4)으로 2회 세척하였으며 1회 세척 시에는 20ml, 2회 세척 시에는 10ml를 사용하고 잔여액은 pipette으로 제거하였다. 1%의 trypsin 50ml를 넣고 30초간 실온에 둔 뒤 trypsin 용액을 버리고 바닥에 잔여액 약 1ml가 든 flask를 CO₂ 배양기에 5분간 두었다. 성장배지 10ml로 분리된 세포를 회수하여 1,000rpm에서 10분간 원심분리하여 trypsin을 제거한 후 성장배지로 세포수가 ml당 2x10⁶개가 되도록 조정하였다.

96well plate(Corning, NY, USA)에 well당 100μl 씩 세포를 분주하여 CO₂ 배양기에 24시간 배양한 후 배양액을 버리고 인산완충용액으로 1회 세척한 후 각 well에 성장배지를 50μl 씩 첨가하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide (MTT, 98%, MW 414, C₁₅H₁₆ Br₅NS, Jensen Chemical, Belgium)을 인산완충용액에 2mg/ml가 되도록 녹인 후에 각 well에 50μl씩 첨가하여 4시간동안 CO₂배양기에서 배양한 후 MTT용액을 버리고 DMSO (Dimethyl sulfoxide, SO(CH₃)₂, MW 78.1, Merck)용액을 well당 50μl씩 넣고 Tray mixer (Fujizoki Pharmaceutical Co., FM 5-1, Japan)로 용액을 균일하게 혼합하였다.

결과는 ELISA Reader II (Behring, Serial No. 350160, Germany)에서 측정파장 570nm, 참고파장 650nm로 흡광도를 측정한 후 대조군에 대하여 실험군에서 생성된 formazan 결정의 흡광도를 다음과 같이 계산하여 세포생존율을 측정하였다.

세포생존율은 taxol 처리나 방사선조사가 끝난 시점에서 1일이 경과된 군을 1일군으로, 4일

$$\text{세포생존율(Survival Ratio)} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}$$

이 경과된 군을 4일군으로 하여 측정하였다.

5. 세포의 형태변화 관찰

배지 8 ml가 든 25cm² flask에 1x10⁵ 개의 세포를 넣고 3일간 배양하였다. taxol처리, 방사선조사와 병행처리를 시행하고 4일이 경과된 후 세포의 형태를 역상현미경으로 100배 확대하여 육안으로 관찰하였다.

6. Prostaglandin 생성능 측정

세포에 10% fetal calf serum이 포함된 Eagle's minimal essential medium을 lipopolysaccharide(LPS) 등의 약물과 함께 37°C에서 배양하였다.

16시간 동안 배양한 후 배지 전량을 -20°C에 보관하였다가 생성된 PGI₂와 PGE₂의 양을 방사면역분석법으로 측정하였다. PGI₂는 내인성 arachidonic acid가 prostaglandin H synthase에 의해 대사되어 생성되는 활성화 형태의 주 대사체이지만 불안정하여 즉시 6-keto-PGF_{1α}로 전환되므로 6-keto-PGF_{1α}를 측정지표로 삼았다.

6-keto-PGF_{1α}와 PGE₂ 정량을 위한 방사면역분석을 하기 위해 적당량의 배지를 취하여 PBS-gel (0.1% gelatin in PBS buffer, pH 7.4)에 희석하여 600μl로 만든 후, 여기에 PGI₂를 분석하기 위해서는 [3H]-6-keto-PGF_{1α} 용액 142 Ci/mM (DuPont NEN, USA) 100μl에 6-keto-PGF_{1α} 항체 200μl를, PGE₂를 분석하기 위해서는 [3H]-PGE₂ 용액 142 Ci/mM 100μl에 PGE₂ 항체 200μl를 가하여 잘 혼합하고 4°C에서 12시간동안 방치하여 반응액 중의 6-keto-PGF_{1α}와 [3H]-6-keto-PGF_{1α}, [3H]-PGE₂와 PGE₂가 항체에 경쟁적으로 결합하도록

하였다. 반응에서 생성된 [6-keto-PGF_{2α}]-[6-keto-PGF_{2α}]와 [PGE₂]-[PGE₂] 항체 복합체를 제외한 유리 6-keto-PGF_{2α}와 PGE₂를 제거하기 위하여 600μl의 charcoal (1mg/ml dextran, 6 mg/ml charcoal in PBS, Sigma, USA)을 가해 섞은 후 4°C에서 15분간 방치하였다. 흡착된 유리 6-keto-PGF_{2α}와 PGE₂는 2000g에서 5분간 원심분리하여 침전시켜 제거하였으며 상층에 남겨진 [3H]-6-keto-PGF_{2α}와 [3H]-PGE₂의 방사능은 liquid scintillation counter (LKB 1211 Rackbeta, Pharmacia LKB, Sweden)를 이용하여 측정하였다. Scintillation cocktail은 xylene과 triton X-100을 3:1의 비율로 혼합한 용액에 PPO(2,5-Diphenyl oxazole)가 0.3% 함유되도록 조제하여 사용하였다. 검체 중의 6-keto-PGF_{2α}와 PGE₂양은 작성된 검량선으로부터 산출하였다.

7. 통계처리

통계처리는 SPSS 프로그램을 이용하여 ANOVA 검정 및 유의수준 0.05에서 Scheffe 방법에 의한 개별비교를 하였으며 회귀분석을 시행하였다.

III. 연구성적

1. Taxol의 세포독성

다양한 농도의 taxol이 각 세포주에 미치는 독성효과를 MTT방법으로 평가한 결과를 보면 KB 세포에서는 모든 농도에서 1일군보다 4일군에서 세포생존율이 감소하였다. 1일군과 4일군 모두에서 5, 50, 100, 200nM 간에는 세포생존율의 유의한 차이가 없었으나 300nM과 500nM에서는 유의하게 감소하였다. RPMI-2650 세포에서는 1일군과 4일군간의 유의한 차이를 보인 농도는 300nM과 500nM 뿐이었다. 1일군에서는 50nM과 100nM간에 유의한 차이가 있는 것을 제외하고는 농도에 따른 유의한 차이가 없는 반면 4일군에서는 50nM과 100nM간, 200nM과 300nM간 및 300nM과 500nM간에 유의한 차이를 보였다. SW-13 세포에서는

농도가 높아갈수록 점차적으로 세포생존율이 감소하였고 특히 1일군에서는 5nM과 50nM사이, 4일군에서는 50nM과 100 nM사이에서 유의한 차이를 보였다. L929 세포에서는 5nM과 50nM에서 1 일군과 4 일군간에 유의한 차이가 있었을 뿐이었으며 농도간 차이도 없었다(Table 1과 Fig. 1).

Taxol의 농도와 각 세포의 세포생존율의 회귀분석에서 KB 세포는 1 일군과 4 일군 모두에서 매우 높은 상관관계를 보였으며 4일군에서는 RPMI-2650 세포가 특히 매우 높은 상관관계를 보였다. L929 세포는 1 일군과 4 일군 모두에서 매우 낮은 상관관계를 보였으며 4 일군에서는 오히려 세포생존율이 약간 증가하는 것으로 나타났다(Table 2).

2. Taxol에 의한 전리방사선의 세포독성 변화

방사선 10Gy를 단일조사한 경우, 500nM taxol에만 처리한 경우, 500nM taxol에 1일간 처리한 후 10Gy를 단일조사한 경우의 세포생존율 변화를 MTT방법으로 평가한 결과 KB 세포와 SW-13세포에서는 방사선조사군, taxol처리군 및 병행처리군 모두에서 1일군과 4일군사이에 유의한 차이가 있었다. 병행처리 1일군에서는 방사선조사군에 비해 세포생존율이 감소하였으나 taxol처리군에 비해서는 오히려 증가하였으며 병행처리 4일군에서는 방사선조사군에 비해 세포생존율이 감소하였으나 taxol처리군과는 유의한 차이가 없었다.

RPMI-2650 세포에서는 taxol처리군과 병행처리군에서 1일군과 4일군사이에 유의한 차이가 있었다. 병행처리 1일군과 4일군 모두에서 방사선조사군에 비해서는 세포생존율이 감소하였으나 taxol처리군과는 유의한 차이가 없었다.

L929 세포에서는 세 군 모두에서 1일군과 4 일군사이에 유의한 차이가 없었다. 병행처리 1 일군에서는 방사선조사군과 taxol처리군에 비해 세포생존율이 유의성있게 감소하였으며 병행처리 4일군에서는 다른 두 군과 비교시 유의한 차이가 없었다(Table 3).

3. 세포의 형태변화

모든 암세포주의 대조군에서는 적당한 증밀도를 보이며 flask 바닥에 넓게 퍼져서 붙어 있었으나 병행처리된 4일군에서는 여러 개의 분열된 핵들이 관찰되었고 사멸하여 바닥에서 떨어져 나와 부유하고 있는 세포들이 많았다(Fig. 2~4). L929 세포에서는 대조군에 비해 병행처리된 4일군에서 더 높은 세포의 증밀도를 보였고 분열된 핵이나 부유된 세포는 관찰할 수 없었다(Fig. 5).

4. Prostaglandin 생성능 측정

(1) PGE₂ 생성

대조군에서 PGE₂는 다른 세포에 비해 KB 세포에서 다량으로 검출되었다. KB 세포에서는 대조군에 비해 방사선조사군, taxol처리군 및 병행처리군 모두에서 유의한 증가를 보였으나 방사선조사군과 병행처리군 사이에는 유의한 차이가 없었고 taxol처리군은 방사선조사군 및 병행처리군과 유의한 차이를 보였다.

RPMI-2650에서는 대조군에 비해 방사선조사군과 병행처리군에서는 유의하게 증가하였으나 두 군간에는 유의한 차이가 없었다. SW-13 세포에서는 병행처리군에서만 대조군, 방사선조사군 및 taxol처리군에 비해 유의한 증가를 나타냈다. L929 세포에서는 대조군에 비해 방사선조사군, taxol처리군 및 병행처리군 모두에서 유의한 감소를 보였으나 세 군간에는 유의한 차이가 없었다(Table 4).

(2) PGI₂ 생성

대조군에서 PGI₂는 다른 세포에 비해 RPMI-2650 세포에서 다량으로 검출되었다. KB 세포에서는 대조군에 비해 taxol처리군과 병행처리군에서 유의하게 증가하였으나 두 군간에는 유의한 차이가 없었다.

RPMI-2650 세포에서는 병행처리군에서 대조군, 방사선조사군 및 taxol처리군에 비해 유의한 증가를 보였을 뿐 세 군간에는 유의한 차이가 없었다. SW-13 세포에서는 taxol처리군과 병행처리군에서는 검출되지 않았으며 대조군과 방사선조사군간에도 유의한 차이가 없었

Table 1. Surviving fractions of cells treated with graded doses of taxol for a 24-hour period in MTT test

Cell line		KB	RPMI-2650	SW-13	L929
Dose (nM)					
5	1. day*	0.96(0.04)** ^a	0.84(0.02) ^d	0.85(0.01) ^t	0.89(0.01) ^g
	4 day	0.79(0.11) ^{+h}	0.84(0.02) ^j	0.82(0.07) ⁿ	0.82(0.02) ^{+p}
50	1. day*	0.94(0.04)** ^a	0.86(0.02) ^d	0.83(0.02) ^t	0.89(0.01) ^g
	4 day	0.84(0.02) ^{+h}	0.86(0.02) ^j	0.76(0.03) ⁿ	0.82(0.02) ^{+p}
100	1. day*	0.96(0.04)** ^a	0.75(0.02) ^e	0.80(0.01) ^t	0.89(0.01) ^g
	4 day	0.69(0.05) ^{+h}	0.73(0.02) ^k	0.61(0.02) ^{+o}	0.82(0.02) ^p
200	1. day*	0.98(0.02)** ^a	0.75(0.02) ^e	0.85(0.01) ^t	0.89(0.01) ^g
	4 day	0.70(0.01) ^{+h}	0.67(0.02) ^k	0.82(0.07) ^{+o}	0.82(0.02) ^{+q}
300	1. day*	0.74(0.01)** ^a	0.74(0.02) ^e	0.85(0.01) ^t	0.89(0.01) ^g
	4 day	0.40(0.02) ^{+h}	0.54(0.02) ⁺ⁱ	0.82(0.07) ^{+o}	0.82(0.02) ^p
500	1. day*	0.60(0.01)** ^a	0.73(0.02) ^e	0.85(0.01) ^t	0.89(0.01) ^g
	4 day	0.26(0.01) ^{+h}	0.43(0.02) ^{+m}	0.82(0.07) ^{+o}	0.82(0.02) ^q

* : elapsed time after end of taxol treatment

** : mean (standard error)

+ : significantly different between values of 1 day and 4 day at 0.05 level

a~q: homogeneous groups that were not different statistically at 0.05 level

Table 2. Regression table of MTT data against graded taxol doses

	Cell	Multiple R	R square	Y=aX+b		
				a	b	Sig T
1 day*	KB	0.82741	0.68460	-7.79720	1.01451	0.0000
	RPMI-2650	0.57118	0.32652	-2.16864	0.82094	0.0003
	SW-13	0.46362	0.21494	-1.32571	0.82765	0.0044
	L929	0.34237	0.11722	-7.78008	0.91013	0.0410
4 day	KB	0.81655	0.71668	-1.20231	0.84733	0.0000
	RPMI-2680	0.93917	0.88203	-8.8884	0.84883	0.0000
	SW-13	0.65428	0.42805	-3.76472	0.71646	0.0000
	L929	0.23381	0.05467	1.95451	0.81180	0.1699

* : elapsed time after end of taxol treatment

Table 3. Surviving fractions of cells treated with 500 nM taxol and 10 Gy radiation in MTT tests

Tx.		Cell	KB	RPMI-2650	SW-13	L929
RD*	1 day**(A)		1.09(0.03)***	1.08(0.02)	1.04(0.02)	0.92(0.02)
	4 day(a)		0.92(0.03) ⁺	1.14(0.03)	0.84(0.01) ⁺	1.28(0.04)
TX	1 day(B)		0.60(0.01)	0.74(0.02)	0.78(0.01)	0.86(0.01)
	4 day(b)		0.26(0.01) ⁺	0.43(0.02) ⁺	0.57(0.01)	0.92(0.08)
CB	1 day(C)		0.74(0.03)	0.71(0.01)	0.92(0.01)	0.78(0.01)
	D day(c)		0.23(0.02) ⁺	0.24(0.03) ⁺	0.64(0.04) ⁺	1.13(0.05)
difference between groups			A/B/C/A b/a/c.b	B/A/C,B b/a/c.b	A/B/C/A b/a/c.b	A/C/B,A a/b.c.a

* : RD: radiation, TX: taxol, CB: combination of RD and TX

** : elapsed time after end of taxol treatment

***: mean(standard error)

⁺ : significantly different between values of 1 day and 4 day at 0.05 level

[^] . [^] : significantly not different between neighboring groups at 0.05 level

[^] / [^] : significantly different between neighboring values at 0.05 level

Table 4. The effect of taxol and 10 Gy radiation on PGE₂ production

unit: pg/ml

Tx.	Cell line	KB	RPMI-2650	SW-13	L929
CT*		12745.00 (746.37)*** ^a	29.19 (4.97) ^t	1617.50 (50.56) ^h	146.26 (22.77) ^e
RD		17330.25 (401.06)	137.08 (5.32) ^g	12445.00 (880.36) ^h	87.50 (16.56) ^{d,e}
TX		26617.50 (1151.33) ^c	66.11 (0.96) ^{t,g}	3525.00 (213.15)	45.44 (22.48) ^d
CB		17437.75 (345.42) ^b	159.01 (40.07) ^g	58482.50 (13447.50) ¹	32.17 (8.31) ^d

* : CT: control, RD: radiation, TX: taxol, CB: combination of RD and TX

** : mean (standard error)

^{a-1} : homogeneous groups that were not different statistically at 0.05 level

Table 5. The effect of taxol and 10 Gy radiation on PGI₂ production

Cell line Tx.	KB	RPMI-2650	SW-13	1,929
CT*	71.48 (22.16)** ^a	1492.50(92.32) ^l	28.75(17.97) ^h	3.95(3.95) ^d
RD	172.34 (35.60) ^{ab}	4552.50(324.82) ^l	6.29(2.12) ^h	ND
TX	237.69 (22.70) ^{bc}	4082.50(677.65) ^l	ND	21.25(9.27) ^{de}
CB	347.47 (53.61) ^c	9162.50(1621.98) ^g	ND	49.97 (11.87)

* :CT:control, RD:radiation, TX:taxol, CB:combination of RD and TX

** :mean (standard error)

^{a-1} :homogeneous groups that were not different statistically at 0.05 level

ND:not detected

다. L929 세포에서는 방사선조사군에서는 검출되지 않았으며 병행처리군에서 대조군과 방사선조사군에 비해 유의한 증가를 보였다(Table 5).

IV. 고 찰

항암제로 알려진 taxol은 그 작용기전이 colchicine과 vincristine과 같은 약제와는 명확히 구분이 된다. 즉 후자는 세포내 microtubule의 분해를 야기하는 반면 taxol은 microtubule을 안정시키고 집합을 증진시켜 안정적이지만 기능이 없는 microtubule의 형성을 유도함으로써 G2/M기에 세포를 동조시키고 궁극적으로 방사선에 대한 감수성을 증가시킨다^{3, 7)}. 또한 taxol은 세포골격의 유지에 기여하는 microtubule의 세포기능 즉 세포형태유지, 운동성, 세포간의 물질수송 및 세포부착 등에 큰 영향을 미친다. Schiff 등⁸⁾은 tubulin에 작용하는 항체를 이용하여 이런 세포형태의 변화가 평행상태의 다발로 자주 발견되는 조직화되지 못한 특징적인 microtubule의 형성에 관련이 있다고 보고하였다.

세포주기에 따라 방사선감수성이 다양하다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. Sinclair 등^{33, 34)}은 chinese hamster의 세포를 이용하여 M기의 세포가 가장 방사선에 예민하고 초기 G1기와 S말기에 가장 저항성이 높다고 하였다. 또한 그 이전의 많은 다른 학자들도 다양한 조직에서 배양한 세포에서 유사한 결과를 얻었다고 보고하였

다³⁵⁾. 그러므로 화학요법제를 이용하여 세포주기를 방사선에 예민한 G2/M기에 정지시킬 수 있다면 방사선치료 효과를 상승시킬 수 있을 것이라는 가설하에 많은 실험이 이루어졌다^{34, 35, 37)}.

방사선에 의한 세포사의 유형은 괴사와 apoptosis로 알려져 있다. 두가지 유형의 세포의 죽음에 대한 형태학적인 관찰은 전자현미경과 광학현미경으로 관찰이 가능하였다³⁶⁾. 그러나 전자현미경적인 관찰이 더욱 확실한 증거가 되며 광학현미경적 관찰시에는 부가적인 검사 방법이 시행되어야 한다. apoptosis의 전자현미경적인 특징으로는 초기에는 염색질의 농축, 핵막의 변화와 세포질의 위축 등이 관찰되나 세포내 소기관들이 정상형태를 유지하였다. 더욱 진행시에는 핵의 분할 및 세포질의 위축으로 apoptotic bodies가 생기고 궁극적으로 이들은 거식세포에 흡입되었다. 광학현미경적 관찰에서는 주로 apoptotic bodies의 관찰에 의존하나 농염되고 분할된 핵과 위축된 세포질의 형태를 관찰할 수 있게 되었다. 본 실험에서도 분할된 핵과 apoptotic bodies로 여겨지는 작은 세포조각들이 관찰되었다.

Yanagihara 등³⁶⁾은 인체의 여러 암종에서 분리해 낸 몇 가지 암세포주와 정상 섬유모세포에서 다양한 선량의 방사선을 조사하여 실험한 결과 6 Gy 내지 8 Gy의 방사선조사량에서 각 암세포주는 조사 후 약 12 시간부터 apoptosis가 발견이 되어 거의 4 일까지 계속 apoptosis가 증가됨을 관찰하였다. 이번 실험에서도 인체의 암세

포들이 예비실험에서 방사선 조사후 4일째에 가장 낮은 세포생존율을 보였기 때문에 apoptosis의 초기인 1일과 최고조에 다다른 4일째에 세포생존율을 측정하였다.

실험결과는 세포주의 종류, 약물농도, 약물의 처리시간 및 검출방법 등에 따라 다양하였으나 일반적인 몇 가지 결론이 얻어졌다. 첫째, 세포주기가 활발한 세포가 어느 한 주기에 정제되어 있는 세포에 비해서 방사선에 대한 감수성이 매우 높았다. 둘째, 세포독성과 방사선감수성의 증가비율은 세포주에 따라 다르며 이는 세포 자체의 내적인 요인에 의한 감수성에 의한 것이다. 셋째, 고농도 taxol에 의한 방사선감수성의 증가는 저농도에 의한 것보다 낮다. 넷째, 방사선에 대한 세포의 감수성과 세포주기의 이상은 taxol의 처리시간과 농도에 의존한다. 즉 가장 높은 방사선감수성은 상대적으로 낮은 taxol의 농도와 긴 조사시간에 의해서 얻어졌다. 다섯째, 세포분열의 억제가 taxol에 의한 방사선감수성 증가에 필수적이지만 taxol의 G2/M기 차단은 다양하게 세포의 방사선감수성을 증가시켰다. 여섯째, 방사선에 의한 세포 생존곡선에서 알파성분의 크기와 같은 세포 내적인 특성²⁰⁾, G1기 차단과 같은 다른 세포주기의 이상에 대한 역학적 감수성¹⁰⁾ 그리고 tubulin에 의해 조절되는 다른 세포기능에 대한 영향³⁾ 등은 모두 약제 및 방사선에 관련된 반응에 영향을 준다.

Tishler 등¹⁵⁾은 taxol의 세포독성 및 방사선증감효과에 대한 연구에서 taxol에 의한 세포독성은 약물의 농도 및 처리 시간에 의존하여 증가한다고 하였으며 1 nM taxol에서는 0.1%, 10nM taxol에서는 5%, 100nM taxol에서는 90%의 세포수의 감소를 보이고 10nM taxol에 세포를 노출시에 약 16 시간에서 24 시간만에 G2/M기의 세포수가 최고치에 이른다고 하였고 또한 1 nM에 비해 10 nM에서 방사선증감효과가 더 많이 나타나는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 10 Gy의 방사선에 의한 세포독성에 비해 500 nM taxol에 의한 세포독성이 많은 부분에서 더 높은 것으로 나타났고 이것은 Tishler의 실험결과와 비교시에 taxol의 농도가 너무 높을 가능성이 많았다. 그러나 10 Gy 방사선의 단독 조사시보다 taxol과의 병행처리시 더 높은

세포독성을 보인 것은 지금까지 밝혀진 taxol의 방사선증감효과에 의한 결과라고 사료되고 앞으로 더 저농도의 taxol과 다양한 조사량의 방사선에 의한 세포생존율의 변화를 관찰할 필요가 있다고 생각된다.

Taxol의 세포독성은 KB 세포와 RPMI-2650 세포에서는 농도의 증가에 따라 세포독성도 증가하였으나 SW-13 세포에서는 다소의 증가 양상을 보였을 뿐이며 정상 생쥐의 섬유모세포인 L929 세포에서는 거의 상관관계가 없었다 일반적으로 설치류의 세포는 인간의 세포에 대해 taxol에 비해 감수성이 낮은 것으로 보고되고 있다^{15,38)}. Hei 등¹⁸⁾은 taxol이 쥐의 섬유모세포인 C3H 10T1/2 세포에 비해 인간의 성세포종(astrocytoma)에서 얻어진 세포에 거의 500배정도 높은 세포독성을 보였다고 하였다. 그러나 이런 감수성의 큰 차이를 설명할 만한 기전은 아직 밝혀진 것이 없으나 추측되는 가정으로는 약제의 섭취와 유출이 두 세포간에 차이가 있고 또한 이런 약제의 대사에서도 차이가 있을 것이라는 점이다. Tishler 등³⁹⁾은 인간의 성세포종에서 얻어진 세포를 사용하여 taxol과 전리방사선 간에 세포독성의 상승작용이 있음을 보고하였다. Hei 등¹⁸⁾은 C3H 10T1/2 세포에서 taxol처리와 방사선조사사이에 부가작용이 있음을 보고하였고 Geard 등⁴⁰⁾은 자궁경부 편평상피암에서 분리 배양된 세포에서 taxol과 방사선치료의 세포독성에 대한 부가작용을 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 인체 구강내 유포피암종의 세포인 KB 세포주와 인체의 비중격에서 발생한 분화도가 낮은 편평상피암으로 부터 얻어진 RPMI-2650 세포주에서 독립적으로 처리시에 나타난 세포독성에 비해 병행처리시에 약간 더 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나 명확한 부가작용이나 상승작용은 관찰되지 않았다. 또한 쥐의 섬유모세포인 L929 세포주와 부신피질에서 발생한 선암에서 얻어진 SW-13 세포주에서는 오히려 taxol 단독투여시보다 전리방사선과 병행처리시에 세포독성이 약간 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 위의 결과를 볼 때 taxol은 세포종류에 따라 선택적으로 세포독성을 나타내며 주로 상피조직에서 기원된 암세포에서 세포독성의 부가작용을 나타내는 것으로

로 유추할 수 있다. 선조직에서 발생한 섬암의 세포에서 얻어진 SW-13 세포주에 대한 taxol의 효과는 세포분열이 매우 느린 선조직의 특성과 연계를 지을 수 있다.

Hei 등¹⁸⁾은 cis-platinum 또는 전리방사선이 C3H 10T1/2 세포에서 유의성 있는 형질변환을 일으키는 것에 비해 taxol은 심지어 높은 세포독성을 보이는 고농도에서조차도 자연적으로 발생하는 수준의 형질변환만을 보이는 것으로 보고하였다. 이와 비슷한 소견이 vincristine과 colcemid 등의 항microtubule 물질을 사용한 실험결과에서도 나타났다^{41, 42)}. 그러나 Syrian hamster 태아세포에서는 taxol에 의한 형질변환의 결과가 반대되는 것으로 나타났으나⁴³⁾ 이는 세포 분석방법의 차이에 기인된 것으로 추측하고 있다.

치사량에 가까운 양의 전리방사선의 조사 후 세포에서 일어나는 생화화적인 사건들은 아직 완전히 이해되고 있지 않다. 일부 학자들은 prostaglandin이 방사선치료에 의해서 발생된 장염의 임상적 발현의 원인인자라고 주장하였고^{28, 44~46)} 인간과 동물의 실험에서 이런 증상은 prostaglandin 억제제에 의하여 완화되거나 제거된다고 하였다. Eisen과 Walker⁴⁷⁾는 700 rad의 방사선이 전신에 조사된 쥐의 대부분의 조직에서 증가된 prostaglandin의 활성도를 관찰하였다고 보고하였다. 그러나 방사선이 조사된 장은 prostaglandin의 활성도가 최소한으로 나타났으며 유의성 있는 차이를 나타내지 못했다고 하였다. Lifshitz 등⁴⁸⁾은 부인과적 악성종양 때문에 골반부위에 방사선을 조사 받은 환자가 소화기에 통증을 호소하여 환자의 혈청을 검사하였으나 어떠한 prostaglandin의 증가도 발견할 수 없었다고 하였다.

prostaglandin은 다양한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 농도에 따라 동일한 조직에서 상반된 두가지 작용을 나타내는 경우도 있다. prostaglandin의 보호작용 측면의 여러 증거가 나타나고 있는데 특히 동물실험 결과 장에서 PGE₂는 급만성의 위 또는 십이지장의 궤양의 예방과 치유에 효과적이라고 보고하였다⁴⁹⁾. 그 후 Van Trappen⁵⁰⁾은 인간에서도 이와 유사한 결과가 관찰되었음을 보고하였다. prostaglandin

의 세포보호작용의 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 그러나 점액생산의 자극⁵¹⁾, 세포탈락의 방지⁵²⁾, 세포분해효소 분비억제²³⁾ 및 세포막 재생 등의 몇 가지 가능성이 제시되고 있다.

Cyclooxygenase pathway를 통해서 생산되는 prostaglandin의 산물은 크게 3가지로 분류할 수 있다. PGE₂, thromboxane A₂ 그리고 prostacyclin이 그것으로서 이번 실험에서는 이 3가지 모두를 검출하였으나 이중 매우 불완전하여 바로 thromboxane B₂로 전환되는 thromboxane A₂는 피코그램 단위에서 검출되지 않았다. 일반적으로 PGE₂의 약리작용은 Na의 체외 배설을 촉진시키고 renin의 분비촉진, 위산분비의 억제, 파골세포의 증식을 통한 골흡수, lymphokine의 생성 및 분비촉진 그리고 통증 및 종창유발 등 다양한 생체작용을 보이고 있다. 또한 thromboxane은 강력한 혈소판 응집의 효과를 보이고 반대로 prostacyclin은 혈소판 응집을 예방하는 것으로 알려져 있다.

prostaglandin의 작용을 보면 대부분 혈액과 관계가 많으며 이런 이유로 대부분의 학자들은 혈관의 내피세포를 중심으로 이루어졌고 일부 학자는 소화기에서 장운동이나 궤양을 소재로 연구가 이루어 졌다. 그러나 저자는 악안면 영역의 점막상피에서 기원된 종양세포와 선조직에서 발생한 선종세포 및 쥐의 섬유모세포에서 prostaglandin이 어느 정도 생산되며 방사선조사와 taxol처리가 prostaglandin 양의 변화에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 섬유모세포에서는 예상대로 방사선감수성이 낮았고 prostaglandin 검출량도 극히 적었으며 특히 PGE₂는 대조군에 비해 방사선 및 taxol 조사 시에 매우 감소하는 것으로 실험결과 나타났다. 비중격에서 유래된 세포주인 RPMI-2650 세포에서는 대조군에서 다른 세포주에 비해 PGI₂가 매우 많이 생성되고 있었으며 방사선 및 taxol의 처치에 의해 부가작용을 나타냈다. 방사선을 처리한 L929세포주와 taxol 또는 병행처리를 한 SW-13세포주에서는 검출되지 않았으며 대조군에서는 미량이나마 검출된 결과를 보았을 때 L929 세포에서는 방사선처리에 의해서, SW-13세포에서는 taxol 또는 병행처리에 의해 PGI₂의 생산이 급격히 감소함을 유추할 수 있다.

PGE₂는 KB세포와 SW-13세포의 대조군에서 매우 많은 양이 검출되었으며 특히 SW-13세포의 경우 방사선조사시에는 대조군에 비해 7.69배의 증가를 보였고 방사선과 taxol의 병행처리시 96.16배의 상승작용을 보여 방사선 조사후 선조직의 위축 및 퇴축에 PGE₂의 관련가능성을 내포하고 있다고 할 수 있다. 일반적으로 방사선조사 후 prostaglandin이 감소하는 것으로 알려지고 있으나 이번 실험에서는 상피조직 기원의 종양세포에서는 증가하는 것으로 관찰되었다. 앞으로 구강 점막상피세포와 부신피질 선종세포에서의 prostaglandin의 증가와 taxol의 역할 및 기전 등에 관한 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

한국세포주은행에서 분양받은 3종의 인체 암세포주(KB, RPMI-2650, SW-13)와 1종의 생쥐 섬유모세포주(L929)를 배양하여 다양한 농도(5, 50, 100, 200, 300, 500 nM)의 taxol로 처리한 후 1일후와 4일후에 MTT*분석법으로 세포생존율을 구하여 세포독성 변화를 관찰하였으며 또한 500 nM taxol처리군, 10 Gy 방사선조사군, 두 가지의 병행처리군에서 각 세포주의 세포생존율과 prostaglandin 중 PGE₂와 PGI₂의 양을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. KB 세포에서는 taxol처리 1일군에 비해 4일군에서 세포독성이 증가하였으며 양군 모두에서 taxol 농도와 세포독성간에 높은 상관관계를 보였다(1일군 R=0.82741, 4일군 R=0.84655).
2. RPMI-2650 세포에서는 고농도 taxol처리군에서만 1일군에 비해 4일군에서 세포독성이 증가하였으며 4일군에서 taxol농도와 세포독성간에 매우 높은 상관관계를 보였다(R=0.93917).
3. SW-13 세포에서는 저농도 taxol처리군을 제외하고는 1일군에 비해 4일군에서 세포독성이 증가하였으며 양군 모두에서 taxol농도와 세포독성간에 높은 상관관계를 보이지 않았다. (1일군 R=0.46362, 4일군 R

=0.65425).

4. L929 세포에서는 저농도 taxol처리군에서만 1일군에 비해 4일군에서 세포독성이 증가하였으며 taxol농도와 세포독성간에 상관관계는 매우 낮았으며(1일군 R=0.34237, 4일군 R=0.23381) L929 1일군을 제외하고는 10Gy 방사선조사군에 비해 500nM taxol처리군에서 세포독성이 컸으며 L929 1일군에서만 taxol의 방사선 증감효과를 관찰할 수 있었다.
5. 모든 암세포주에서는 병행처리 4일군에서 여러 개의 분열된 핵과 많은 부유세포들이 관찰되었으나 L929 세포에서는 더 높은 세포충밀도를 보였으며 분열된 핵이나 부유세포는 관찰할 수 없었다.
6. PGE₂는 KB 세포에서 가장 많이 검출되었으며 모든 암세포주는 실험군이 대조군에 비해 증가 하였으나 L929 세포에서는 감소하였고 SW-13 세포에서만 병행처리군이 다른 군에 비해 유의성있게 증가하였다. PGI₂는 RPMI-2650 세포에서 가장 많이 검출되었으며 SW-13 세포를 제외하고는 모두 증가하였고 RPMI-2650 세포에서만 병행처리군에서 다른 군에 비해 유의성있게 증가하였다.

참고문헌

1. Foa R, Norton L, Seidman AD: Taxol (paclitaxel): A novel anti-microtubule agent with remarkable anti-neoplastic activity. *Int J Clin Lab Res* 24:6-14, 1994.
2. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, et al: Taxol: A unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 111:273-279, 1989.
3. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC: Taxol: A novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst* 82:1247-1259, 1990.
4. Holmes FA, Frye D, Theriault RL, Walters RS, Forman AD, Newton LK, et al: Phase II study of taxol in patients with metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 10:60, 1991.
5. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Raber M,

- Benjamin RA: Phase II study of taxol in metastatic melanoma. *Cancer* 65:2478-2481, 1990.
6. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, Mcphail AT: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93:2323-2327, 1971.
 7. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277:665-667, 1979.
 8. Schiff PB, Horwitz SB: Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1561-1565, 1980.
 9. Liebmann J, Cook JA, Lipschultz C Teague D, Fisher J, Mitchell JB: Cytotoxic studies of paclitaxel(Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer* 68:1104-1109, 1993.
 10. Liebmann J, Cook JA, Lipschultz C Teague D, Fisher J, Mitchell JB: The influence of Cremophor EL on the cell cycle effects of paclitaxel(Taxol) in human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 53:31-339, 1994.
 11. Bhalla K, Ibrado K, Tourkina E, Tang C, Mahoney ME, Huang Y: Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 7:563-568, 1993.
 12. Hruban RH, Yardley JH, Donehower RC, Boetnott JR: Taxol toxicity: Epithelial necrosis in the gastrointestinal tract associated with polymerized microtubule accumulation and mitotic arrest. *Cancer* 63:1944-1950, 1989.
 13. Milas L, Hunter NR, Kurdoglu B, Mason KA, Meyn RE, Stephens LC, et al: Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with Taxol(paclitaxel). *Cancer Chemother Pharmacol* 35:297-303, 1995.
 14. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC: Clinical toxicities encountered with paclitaxel(Taxol). *Semin Oncol* 20:1-15, 1993.
 15. Tishler RB, Schiff PB, Geard CR, Hall EJ: Taxol, A novel radiation sensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22:613-617, 1992.
 16. Choy H, Rodriguez FF, Koester S, Hilsenbeck S, Von Hoff DD: Investigation of taxol as a potential radiation sensitizer. *Cancer* 71:3774-3778, 1993.
 17. Cook JA, Teague D, Fisher J, Liebmann JE: Radiosensitization of Chinese hamster V79 cells by taxol. *Radiat Oncol Invest* 1:103-110, 1993.
 18. Hei TK, Hall EJ: Taxol, radiation and oncogenic transformation. *Cancer Res* 53:1368-1372, 1993.
 19. Hei TK, Piao CQ, Geard CR, Hall EJ: Taxol and ionizing radiation: Interaction and mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29:267-271, 1994.
 20. Liebmann J, Cook JA, Fisher J, Teague D, Mitchell JB: Changes in radiation survival curve parameters in human tumor and rodent cells exposed to paclitaxel(Taxol). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29:559-564, 1994.
 21. Liebmann J, Cook JA, Fisher J, Teague D, Mitchell JB: In vitro studies of Taxol as a radiation sensitizer in human tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 86:441-446, 1994.
 22. Steren A, Sevin B, Perras J, Angioli R, Nguyen H, Guerra L, et al: Taxol sensitizes human ovarian cancer cells to radiation. *Gynecol Oncol* 48:252-258, 1993.
 23. Filshie G: Further clinical studies with prostaglandins in reproductive physiology. *Ann NY Acad Sci* 180:553-568, 1971.
 24. Barr W, Naismith WCMK : Oral prostaglandins in the induction of labor. *Br Med J* 2:88-91, 1972.
 25. Horton EW, Main IHM, Thompson CJ, Wright PM: Effect of orally administered prostaglandin E1 on gastric secretion and gastrointestinal motility in man. *Gut* 9:655-658, 1968.
 26. Misiewicz JJ, Walker SL, Kiley N, Norton EW: Effect of oral prostaglandin E1 on intestinal transit in man. *Lancet* 1:648-651, 1969.
 27. Eisen V, Walker DI, Binysh SG, Tedder RS: Prostaglandins and complement changes in some conditions related to inflammation. In recent Developments in the Pharmacology of inflammatory Mediators, Bonta, I.L.(Ed.), Basel und Stuttgart, Birkhauser Verlag. pp.99-103, 1977.
 28. Borowska AS, Sierakowski S, Mackowiak J, Wisniewski K: A prostaglandin- like activity in small intestine and post-irradiation gastrointestinal syndrome. *Experientia* 35:1368-1370, 1979.
 29. Tanner NSB, Stamford IF, Bennett A : Plasmaprostaglandins in mucositis due to radiotherapy and chemotherapy for head and neck cancer. *Br J Cancer* 43:767-771, 1981.
 30. 김민숙, 고광준: 수종의 암세포주의 저선량방사선감수성에 관한 연구. *치과방사선* 24:249-260, 1994.
 31. 고경환, 하성관, 박찬일: 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구. *J Korean Soc Ther radiol* 11:17-27, 1993.

32. 이삼선, 유동수: 수종의 암세포주와 치은섬유아 세포에서 방사선의 양과 분할조사에 따른 세포 활성도와 독성의 변화에 관한 연구. *치과방사선* 27:107-122, 1997.
33. Sinclair WK, Morton RA: X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res* 29:450-475, 1973.
34. Sinclair WK: Dependence of radiosensitivity upon cell age. In: *Proceedings of the Carmal Conference on Time and Dose Relationships in Radiation Biology as Applied to Radiotherapy*. 97-107, 1969.
35. Terasima R, Tolmach LJ: X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells. *Science* 140:490-492, 1963.
36. Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Tauchi H, Sawada S, Seito T: Radiation-induced apoptotic cell death in human gastric epithelial tumour cells: correlation between mitotic death and apoptosis. *Int J Radiat Biol* 67:667-685, 1995.
37. Schwartz LM, Osborne BA: *Methods in Cell Biology: Cell death*. volume 46 pp.1-27 Academic Press Inc, 1995.
38. Lopes NM, Adams EG, Bhuyan BL: Cell kill kinetics and cell cycle effects of taxol on human and hamster ovarian cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 32:1957, 1991.
39. Tishler RB, Geard CR, Hall EJ, Schiff PB: Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation. *Cancer Res* 52:3495-3497, 1992.
40. Geard CR, Jones JM, Schiff PB: Taxol and radiation. *J Natl Cancer Inst* 1993.
41. Benedict WF, Banerjee A, Gardner A, Jones PA: Induction of morphological transformation in mouse C3H 10T1/2 clone 8 cells and chromosomal damage in hamster A[T1]C1-3 cells by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 37:2202-2208, 1977.
42. Borek C, Hall EJ: Oncogenic transformation produced by agents and modalities used in cancer therapy and its modulation. *Ann NY Acad Sci* 397:193-210, 1982.
43. Tsutsui T, Suzuki N, Maizumi H, Barrett JC: Vincristine sulfate induced cell transformation, mitotic inhibition and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 7:131-135, 1986.
44. Mennie AT, Dalley VM: Aspirin in radiation-induced diarrhea. *Lancet* 1:1131, 1973.
45. Mennie AT, Dalley VM, Dinneen LC, Collier HOJ: Treatment of radiation-induced gastrointestinal distress with acetylsalicylate. *Lancet* 2:942-943, 1975.
46. Northway MG, Libshitz HJ, Osborne BM, Feldman MS, Mamel JJ, West JH, et al: Radiation esophagitis in the opossum: Radioprotection with indomethacin. *Gastroenterology* 78:883-892, 1980.
47. Eisen V, Walker DI: Effect of ionizing radiation on prostaglandin-like activity in tissues. *Br J Pharmacol* 57:527-532, 1976.
48. Lifshitz S, Savage JE, Taylor KA, Tewfik HH, Van Orden DE: Plasma prostaglandin levels in radiation-induced enteritis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8:275-277, 1982.
49. Robert A: Antisecretory, antinuclear, cytoprotective and diarrhoeogenic properties of prostaglandins. In *Advance Prostaglandin and Thromboxane research*, Vol.2, Samuelsson B and Paoletti R (Eds.) NY, Raven Press, pp. 507-520, 1976.
50. Van Trappen G, Popiela T, Tytgat DNJ, Lambert R, Robert A: A multicenter trial of 15(R)-15-methyl prostaglandin E2 in duodenal ulcer. *Gastroenterology* 78:1283, 1980.
51. Nezamis JE, Robert A: Gastric mucus may mediate the cytoprotective effect of prostaglandins. *Gastroenterology* 78:1228, 1980.
52. Robert A, Hanchar AJ, Lancaster C, Nezamis JE, Culp JW, Li LH: Prevention of cellular shedding as a mechanism of gastric cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 78:1244, 1980.

Effects of taxol and ionizing radiation on cytotoxicity and prostaglandin production in KB, RPMI-2650, SW-13 and L929

Keon-II Lee · Dong-Soo You*

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Wonkwang University

** Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute,
College of Dentistry, Seoul National University*

The author evaluated the effects of taxol, a microtubular inhibitor, as a possible radiation sensitizer and the production of prostaglandins on three human cancer cell lines (KB, RPMI-2650 and SW-13) and one murine cell line (L929). Each cell line was divided into four groups (control, taxol only, radiation only and combination of taxol and radiation).

The treatment consisted of a single irradiation of 10 Gy and graded doses (5, 50, 100, 200, 300, 500 nM) of taxol for a 24-h period. The cytotoxicity of taxol alone was measured at 1 day after (1-day group) and 4 days after (4-day group) the treatment. The survival ratio of cell was analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyl tetrazolium bromide) test. Prostaglandins (PGE₂ and PGI₂) were measured in the culture medium by a radioimmunoassay.

The results obtained were as follows.

1. There was a significantly increased cytotoxicity of KB cells in 4-day group than those in 1-day group. There was a high correlation between doses of taxol and cell viability in both groups (1-day group $R=0.82741$, 4-day group $R=0.84655$).
2. There was a significantly increased cytotoxicity of RPMI-2650 cells treated with high concentration of taxol in 4-day group than those in 1-day group. Also there was a high correlation between doses of taxol and cell viability in 4-day group ($R=0.93917$).
3. There was a significantly increased cytotoxicity of SW-13 cells treated with high concentration of taxol in 4-day group than those in 1-day group. However no high correlation was observed between doses of taxol and cell viability in both groups (1-day group $R=0.46362$, 4-day group $R=0.65425$).
4. There was a significantly increased cytotoxicity of L929 cells treated with low concentration of taxol in 4-day group than those in 1-day group. At the same time, there was a low correlation between doses of taxol and cell viability in both groups (1-day group $R=0.34237$, 4-day group $R=0.23381$).
5. In 1-day group of L929 cells, higher cytotoxicities were observed in the groups treated with 500 nM taxol than given 10 Gy radiation alone. L929 cells in 1-day group alone showed a radiosensitizing effect by taxol.
6. In addition to L929 cells, all cancer cells treated with a combination of taxol and radiation in 4-day group appeared to have some fragmented nuclei and to float on the medium. In addition, L929 cells appeared to be more confluent.
7. The level of PGE₂ production was the highest in the control KB cells. This appeared to increase in every experimental group of all three cancer cells except L929 cells. There was a significantly increased

production of PGE₂ in SW-13 cells treated with a combination taxol and radiation compared to the other experimental groups.

8. The level of PGI₂ production in the control group of RPMI-2650 cells was the highest. This appeared to increase in every experimental group of all cells except in SW-13 cells. This also increased significantly in RPMI-2650 cells treated with a combination of taxol and radiation compared to the other experimental groups.

*Key words: irradiation, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide), taxol(paclitaxel), prostaglandins

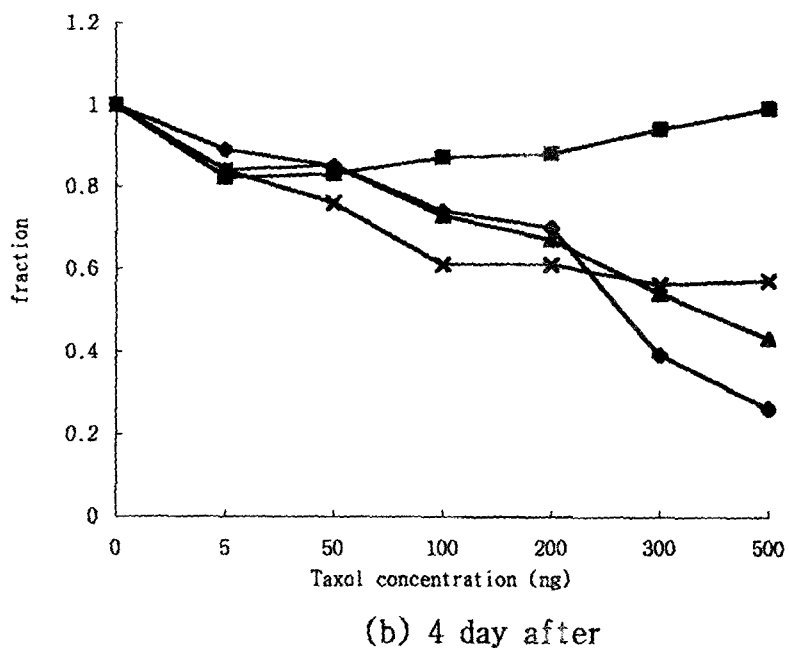
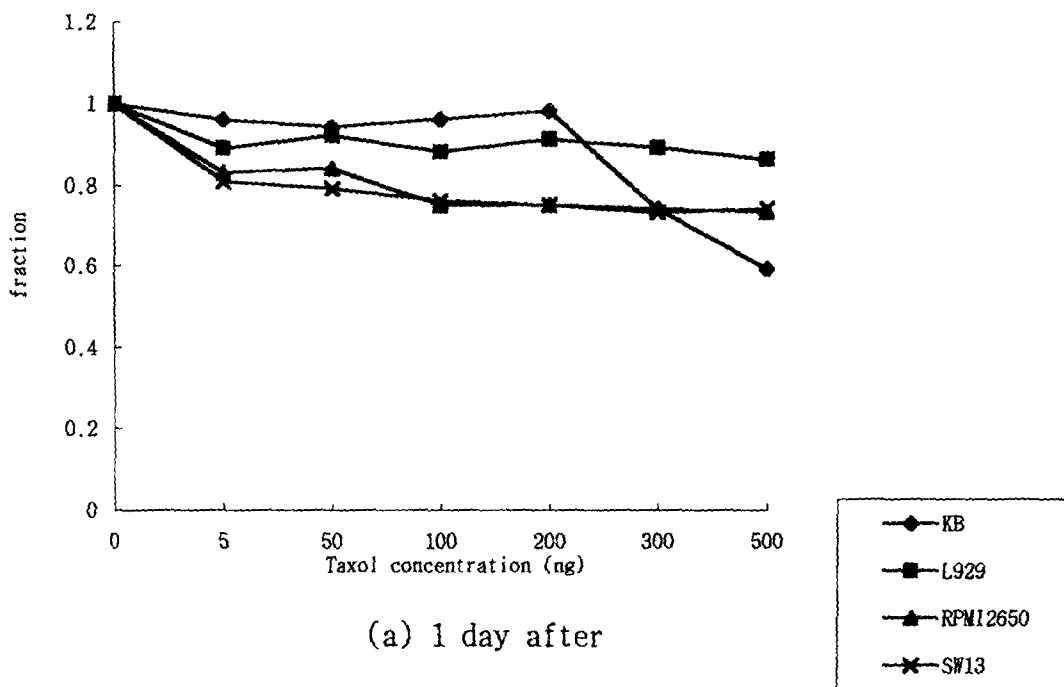
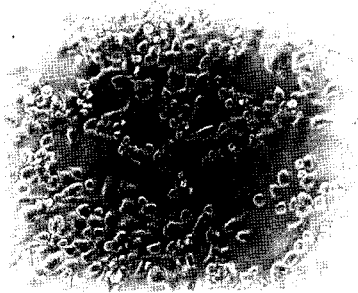


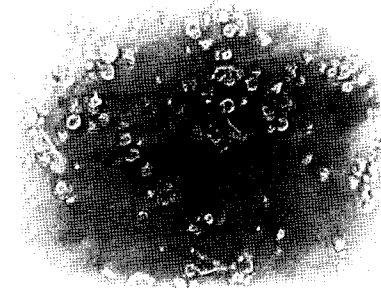
Fig. 1 Surviving fractions of cells treated with graded doses of taxol for a 24-hour period.

- Fig. 2 An inverted photomicrograph of KB cells ($\times 100$)
(a) cultured in control media.
(b) treated with 500 nM taxol and 10Gy irradiation(4 day after).
- Fig. 3 An inverted photomicrograph of RPMI-2650 cells ($\times 100$)
(a) cultured in control media.
(b) treated with 500 nM taxol and 10Gy irradiation(4 day after).
- Fig. 4 An inverted photomicrograph of SW-13 cells ($\times 100$)
(a) cultured in control media.
(b) treated with 500 nM taxol and 10Gy irradiation(4 day after).
- Fig. 5 An inverted photomicrograph of L929 cells ($\times 100$)
(a) cultured in control media.
(b) treated with 500 nM taxol and 10 Gy irradiation(4 day after).

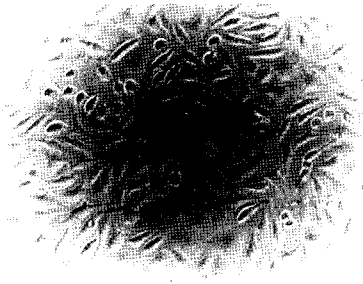
사진부도



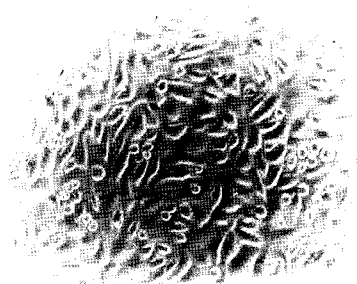
2 (a)



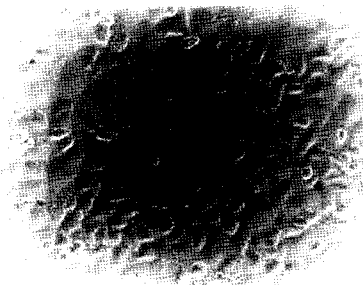
2 (b)



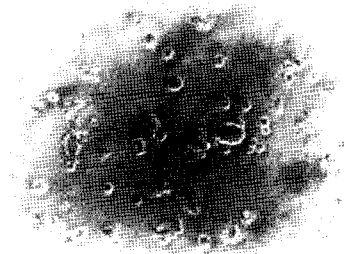
3 (a)



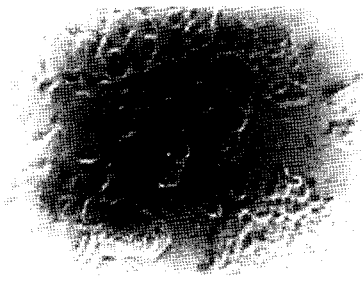
3 (b)



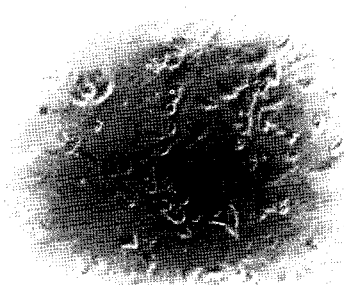
4 (a)



4 (b)



5 (a)



5 (b)