

이종이식된 인체 편평상피세포암에 대한 종양괴사인자의 방사선감작효과에 대한 연구*

단국대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실, 치료방사선과학교실
정필상 · 김한균 · 윤형근

= Abstract =

The Radiation Sensitizer Effect of TNF- α on Heterotransplanted Human Squamous Cell Carcinoma

Phil Sang Chung, M.D., Han Gyun Kim, M.D., Hyong Geun Yun, M.D.
*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Therapeutic Radiology,
Dankook University, College of Medicine, Cheonan, Korea*

Background and Objectives : Numerous studies were conducted to develop radiosensitizers to increase antitumor effect and decrease systemic toxicity of ionizing radiation. In current study, the authors tested the synergistic effect of mutant TNF- α (M₃S) with radiation therapy on heterotransplanted hypopharyngeal squamous cell carcinoma.

Materials and Method : SNU-1041 cell line was heterotransplanted to nude mice. When the tumors grew up to 70mm³ or more, the animals were randomly placed into 4 groups(n=10/group). Group I : 0.1ml of normal saline injected intraperitoneally once a day for 5 days. Group II : 10ug of TNF- α injected intraperitoneally once a day for 5 days. Group III : a single radiation dose of 10 Gy per animal delivered. Group IV : single radiation dose of 10 Gy was delivered 1 hour after intraperitoneal injection of TNF- α 10 ug.

Results : Four weeks after treatment, group IV showed the least tumor growth during the 4 weeks follow up and the relative tumor growth rate(RTG) of each groups after 4 weeks were 31, 5.8, 10, and 3.2 respectively(p<0.05).

Conclusion : These study suggests that pretreatment with TNF- α can significantly enhance the effects of radiation therapy and further studies may be needed for clinical trials of combination treatment of TNF- α and radiation.

KEY WORDS : TNF- α · Radiosensitizer · Squamous cell carcinoma.

서 론

두경부종양의 치료에는 수술과 방사선치료가 주류를 이루고 있지만 현재까지도 치료성적은 과거에 비하여 많은 향상을 보이지 못하고 있다. 방사선치료를 주치료로 할 경우, 수술요법과 동일한 의미로서 국소치료에 속하지만 원발병소 뿐만 아니라 근접한 임파절까지 동

이루고 있지만 현재까지도 치료성적은 과거에 비하여 많은 향상을 보이지 못하고 있다. 방사선치료를 주치료로 할 경우, 수술요법과 동일한 의미로서 국소치료에 속하지만 원발병소 뿐만 아니라 근접한 임파절까지 동

*이 연구는 1996년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

시에 치료 대상범위로 하여 육안적으로 발견되지 않는 부위까지 포함한 선택적조사를 한다는 것과 해부학적 으로 장기 보존적 치료로서 치료후 구조적, 기능적, 미 용적으로 손상을 남기지 않는다는 것이 큰 장점이다. 그러나 방사선치료는 조사후 구강점막, 타액선, 치주 등 방사선 민감성 장기의 손상에 의한 각종 급성 부작용이 일어날 수 있으며, 만성중증 방사선 합병증으로는 하악 골 또는 연부조직 등의 방사선괴사가 발생할 수 있다. 따라서 최근에는 방사선치료의 부작용을 감소시키고 치료효과를 상승시키기 위하여 기존의 항암제와 방사 선치료의 상호작용 기전에 관한 연구가 이루어지고 있 다¹⁾. Cisplatin과 같은 기존의 항암물질을 방사선치료 와 병행하였을때 방사선치료효과를 상승시키는 방사선 감작효과(radiosensitizer effect)가 보고되었으며²⁾, 이 밖에도 주목나무에서 추출한 Placlitaxel(Taxol)³⁾, Nicotinamide⁴⁾, Iododeoxyuridine⁵⁾ 등이 방사선감작제 로서 활발히 연구되고 있다.

1975년 Carswell등은 BCG, Corynebacteria, Zy mosan 등으로 감염시킨 쥐에 Escherichia coli의 내 독소를 주사하여 출혈성 종양괴사가 일어나는 것을 관 찰하였고, 이러한 현상을 일으키는 물질은 내독소 자체 가 아닌 다른 혈청요소임을 확인하고, 혈청요소를 분리 하여 이를 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)⁶⁾ 라고 명명하였다. 종양괴사인자의 항암효과에 대한 연구가 진행되면서 종양괴사인자와 방사선치료의 상호 작용에 대한 연구도 이루어졌다⁷⁾.

이에 저자는 nude mouse에 이종이식된 두경부암역 의 종양세포에 대한 종양괴사인자의 방사선 감작효과 를 관찰하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 종양괴사인자(TNF- α)

종양괴사인자는 한효과학연구소에서 제조한 인체 변 종 종양괴사인자인 M₃S를 사용하였으며 이의 specific activity는 1.0×10^8 units/mg이었다.

2. 세포배양

인체 하인두암환자로부터 수립된 SNU-1041 편평상 피 세포암 세포주를 culture flask(Nunc, USA)에서

RPMI-1041(Gibco BRL, USA) 배양액 500ml에 우 태혈청(Gibco, BRL) 50ml와 antibiotic-antimycotic(Gibco BRL) 5ml를 섞은 세포배양액으로 CO₂배 양기(Vision Korea) 내에서 배양하였다⁸⁾.

3. 실험동물 및 사육조건

본 연구에서 사용된 실험동물은 미국 B & K Uni- versal Inc. 사로부터 수입한 6주령의 BK1 : /BALB/ C/nu/nu 슛컷 nude mouse로서 적절한 온습도가-3 유지되는 동물실험실내에서 방사능 조사로 멸균소독된 사료와 물을 공급하면서 filter-top cage 내에서 사육하 였다.

4. 세포주의 이종이식

Culture flask에서 배양된 세포주를 trypsin으로 처 리하여 세포액을 시험관에 넣고, 현미경하에서 세포의 수를 세고 원심분리하여 세포액의 농도를 10⁷개/ml로 만들었다. SNU-1041 세포주를 10⁷개/0.1ml씩 28G 인 술린 주사기로 nude mouse의 등에 피하주사 하였다.

5. 방사선 조사

본 실험에서 사용한 방사선기는 선형가속기 계열인 CLINAC 1800(General Electrics, USA)으로서 실험동물을 자일라진과 케타민을 근육주사하여 마취한 후 단일 조사선량 10 Gy를 약 10분에 걸쳐 조사하였 다. 방사선 조사시 정상조직을 보호하고 종양부위에만 효과적으로 조사될 수 있도록 납을 이용하여 차폐를 실 시하였다(Fig. 1).

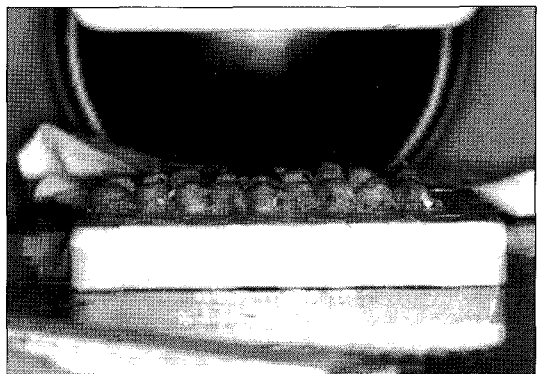


Fig. 1. Single radiation dose of 10 Gy was delivered to animals for 10 minutes in group III and group IV (group III : radiation only, group IV : TNF- α +radiation).

Table 1. The change of tumor volume (mm³)

Group	PRE	1wk	2wk	3wk	4wk	RTG
I	75±18.7	403±98.7	1227±286	1728±432	2329±482	31
II	70±19.6	140±34.2	213±69.6	353±98.9	438±121	5.8 [†]
III	73±22.6	298±92.3	790±253	640±188	755±234	10 [†]
IV	72±21.4	42±11.6	35.6±10.6	73.7±24	245±83.5	3.2*

[†]*p<0.05

RTG : Relative Tumor Growth, PRE : Pretreatment

Group I : normal control, Group II : TNF-α, Group III : Radiation, Group IV : TNF-α+Radiation

6. 이종이식된 인체 하인두 편평상피세포암에 대한 TNF-α의 방사선감작효과

1) 실험동물의 분류 및 종양의 치료

Nude mouse에 SNU-1041 세포주를 피하로 주입하고 이종이식된 종양이 70~80mm³에 도달하였을 때, 실험동물을 각 10마리씩 4개의 실험군으로 나누었다. 제 1군은 정상대조군으로서 생리 식염수 0.1ml를 5회에 걸쳐 복강내에 투여하였고, 제 2군은 종양괴사인자 10ug을 매일 1회씩 5회에 걸쳐 복강내에 투여하였으며, 제 3군에서는 10 Gy의 단일 방사선량으로 방사선 조사를 시행하였다. 제 4군에서는 종양괴사인자 10ug을 복강내에 투여하고 1시간후에 10 Gy의 방사선 조사를 시행하였다.

2) 종양부피의 측정

실험동물에 이종이식된 종양의 부피를 치료시작 전, 치료시작 후 1, 2, 3, 4주의 시점에서 종양의 부피변화를 측정하여 치료효과를 비교하였다. 부피의 계산은 다음의 공식을 이용하였다.

$V(4/3 \times A \times B \times C) \times 1/2$ (v=부피, A=장축, B=단축, C=높이)

3) 항암효과의 판정

항암효과는 각 실험군에서 이식된 암종의 부피의 변화를 4주까지 측정하여 상대적종양증가치(RTG=relative tumor growth)를 측정하여 다른 대조군과 비교하여 repeated measure ANOVA test로 판정하였다.

RTG=(치료 4주 후의 종양부피)/(치료전의 종양부피)

결 과

1. 대조군과 실험군에서의 부피변화

각 대조군과 실험군에 따른 종양의 평균적인 부피변

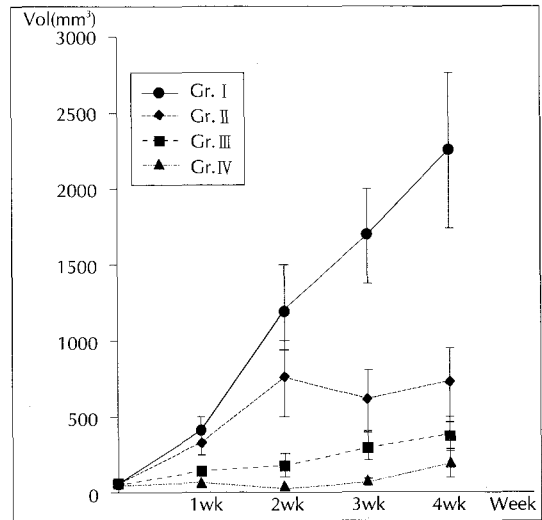


Fig. 2. This graph shows the volume change of heterotransplanted SNU-1041 for each treatment groups. Group IV(TNF-α+radiation) showed the least tumor growth during the 4 weeks follow up(Gr.I : normal control, Gr.II : TNF-α, Gr.III : radiation).

화는 다음과 같았다. 생리식염수 0.1ml를 복강내에 투여한 정상대조군 제 1군에서는 치료전의 종양의 부피가 75mm³이었고 4주후의 종양의 부피는 2329mm³이었으며, TNF-α를 투여한 대조군 제 2군에서는 치료전의 종양의 부피가 70mm³이었고 4주후의 종양의 부피는 438mm³이었다. 10 Gy의 방사선조사만을 시행한 제 3군에서는 치료전의 종양의 부피가 73mm³이었고 4주후의 종양의 부피는 755mm³이었다. TNF-α와 방사선 조사를 병합시행한 실험군인 제 4군에서는 치료전의 종양의 부피가 72mm³이었고 4주후의 종양의 부피는 245mm³이었다(Table 1).

2. 이종이식된 인체 하인두 편평상피세포암에 대한 TNF-α의 방사선감작효과

각 군에서의 상대적종양증가치는 각각 31, 5.8, 10, 그리고 3.2로 나타나 방사선 조사전 TNF-α를 투여한

실험군인 제 4군에서 가장 낮은 종양증가치를 보여 다른 실험군과 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table 1)(Fig. 2).

고 찰

기존의 항암제와 방사선치료의 상호작용기전에 대한 연구가 이루어진 초기에는 한종류의 항암제를 표준 방사선치료와 동시에 투여하였으며 Merlano 등(1992)은 Cisplatin, Mitomycin, Bleomycin등을 투여하여 무병 생존율이 증가하고, 전체 생존율이 개선되는 결과를 보고하기도 하였다⁹⁾. 그러나 이러한 동시 병합치료후에 오는 부작용도 심하게 증가하여 표준 치료법으로는 받아들여지지 않았다. 이후에 화학요법을 방사선치료와 동시에 또는 교대로 병용하는 방법이 연구되었으며 이 경우에도 치료효과는 증가시킬 수 있지만 부작용이 증가하는 경향이 있어 항암제의 양을 줄인다거나 방사선 치료량을 줄이고 치료회수를 늘리는 방법등 여러 방법이 고안되어 사용되고 있다. 이외에 방사선치료효과를 상승시키고 방사선조사에 대한 반응성을 증가시키기 위한 여러종류의 생체반응 조절제(biologic response modifier, BRM)에 대한 관심이 늘어나면서부터, 초기 연구의 대상으로는 BCG¹⁰⁾, anaerobic corynebacteria¹¹⁾ 그리고 muramyl-tripeptide(MTP)¹²⁾등이 있었으며 그중 BCG와 corynebacteria를 이용한 연구가 가장 많았고 연구결과도 다양하였지만 부작용이 많이 발생하여 임상적 이용에는 제한이 따랐다. 최근까지 알려진 방사선감작제중에서 Paclitaxel(Taxol)의 작용기전은 세포내 microtubule의 beta tubulin subunit와 결합하여 세포주기를 가장 방사선에 예민한 시기인 G 2/M 시기에 멈추게 하고³⁾, Nicotinamide는 종양세포내의 혈류량을 증가시켜 산화 대사량(oxidative metabolism)을 상승시킴으로써 방사선 감작효과를 나타내며⁴⁾, Iododeoxyuridine(IdUrd)은 비산소결핍성(non-hypoxic) 세포의 방사선감작제로 이용되고 이온화 방사선에 손상된 종양세포의 회복능력을 감소시키는 것으로 알려져있다⁵⁾.

최근 종양괴사인자의 항암효과가 알려지면서 방사선 치료와의 병합치료에 대한 연구가 시작되었다. 종양괴사인자의 중요한 생물학적인 효과의 하나는 종양괴사인자의 생물학적인 활동성을 증폭시키고, 연장시키는

다른 cytokine 방출을 유발하는 것이다. 즉 종양괴사인자에 의해 유발된 cytokine에는 Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8, Interleukin- γ , GM-CSF, TGF- β 등이 있다¹³⁾. 종양괴사인자의 효과를 증가시키는 cytokine에는 TGF- β , Interleukin-10, 종양괴사인자 결합단백질 등이 있다¹³⁾.

이와같은 체내 면역반응에 관여하는 것 이외에 종양괴사인자는 중추신경계에 대하여 다양한 작용을 가지고 있다. 전신적으로 투여한 종양괴사인자는 체온과 식욕을 조절하는 시상하부 중추부위를 이행하여 발열과 식욕부진을 유발한다¹⁴⁾. 이러한 부작용의 가능성은 종양괴사인자의 임상적 사용을 제한하는 요소가 되고 있다. 최근에는 항암효과는 높고 부작용은 줄인 변종 종양괴사인자를 개발하여 임상적 이용을 시도하고 있다¹⁵⁾. 본 실험에서 사용한 변종 종양괴사인자인 MS는 동물실험에서 기존의 종양괴사인자에 비하여 독성은 1/3로 줄었고 비생체실험에서 항암효과를 10배 정도 증가한 것으로 나타났다.

종양괴사인자는 종양세포에 직접적으로 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며¹⁶⁾ 종양괴사인자의 세포독성효과는 수산화(hydroxyl radical)의 생성과 관련되어 있고 이는 연쇄적으로 DNA의 손상을 유발한다¹⁷⁾¹⁸⁾. 따라서 종양괴사인자에 의한 수산화의 생성과 이로 인한 DNA의 손상은 이온화 방사선의 세포손상효과를 증가시킬 수 있으며 방사선감작제의 중요한 작용기전으로 생각되어진다¹⁸⁾. Hallahan 등(1990)은 여러종류의 세포주를 대상으로 한 실험에서 방사선 조사전 종양괴사인자로 전처리 하였을 경우에만 수산화 또는 다른 radical의 생성이 최대로 증가하고 방사선에 의한 세포손상효과(oxidative damage)를 높여 상승효과(synergistic effect)를 기대할 수 있다고 하였다¹⁹⁾.

현재까지 보고된 대부분의 이온화 방사선과 종양괴사인자의 세포독성 상승작용에 대한 연구는 두경부 영역에서 발생하는 종양의 세포주가 아닌 다른 장기의 종양세포주를 이용하여 주로 비생체 실험으로 이루어졌다²⁰⁾. 저자들은 본 실험에서 이중이식된 하인두 편평상피세포암을 대상으로 종양괴사인자를 먼저 투여한 후 방사선치료를 시행하여, 종양괴사인자를 단독투여하거나 방사선 치료를 단독으로 시행한 경우보다 낮은 상대적 종양증가치를 보여 두경부영역의 편평상피세포암에서도 병합요법의 장점을 확인할 수 있었다.

결 론

두경부 악성 종양의 치료에 있어서 중요한 역할을 차지하는 방사선 치료의 효과를 높여주기 위하여 저자들은 본 실험에서 변종 종양괴사인자인 M₃S로 전처치하여 M₃S를 단독 또는 방사선치료 단독으로 치료한 경우보다 탁월한 종양성장 억제효과를 관찰할 수 있었다. 이과정에서 종양괴사인자와 방사선 치료간의 상승효과를 확인할 수 있었으며 향후 종양괴사인자가 효과적인 방사선 감작제로 사용되기 위해서는 여러 가지 산소 중간산물에 대한 이해 및 세포주기에 따른 반응의 차이에 대한 추가연구가 필요하고 이러한 연구들을 토대로 향후 종양괴사인자의 방사선 감작제로서의 임상적 이용이 가능할 것으로 기대된다.

References

- 1) Aisner J, Hiponia D, Conley B, Jacobs M, Gray W : *Combined modalities in the treatment of head and neck cancers. Sem in Oncol.* 1995 ; 22 : 28-34
- 2) Chougule PB, Steve Suk, Chu QD : *Cisplatin as a radiation sensitizer in the treatment of advanced head and neck cancers. Cancer.* 1994 ; 74 : 1927-1932
- 3) Liebmann J, Cook JA : *In vitro studies of taxol as radiation sensitizer in human tumor cells. J of the National Cancer Institute.* 1994 ; 86 : 441-446
- 4) Kelleher DK, Vaupel PW : *Possible mechanisms involved in tumor radiosensitization following nicotinamide administration. Radiother and Oncol.* 1994 ; 32 : 47-53
- 5) Uhl V, Phillips T, Ross GY : *Iododeoxyuridine incorporation and radiosensitization in therapeutic tumor cell lines. Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991 ; 22 : 489-494
- 6) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL : *An endotoxin induced serum factor that cause necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci USA.* 1975 ; 72 : 3666-770
- 7) Gridley DS, Glisson WC, Uhm JR : *Interaction of tumor necrosis factor-alpha and radiation against human colon tumor cells. Therapeutic Immunol.* 1994 ; 1 : 25-31
- 8) Kim KH, Chung PS, Park JG : *A study of establishment of SNU cell line in the head and neck. Korean J Head and Neck Oncol.* 1996 ; 12 : 181-187
- 9) Merlano M, Vitale V : *Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck with alternating chemotherapy and radiotherapy. NEJM.* 1992 ; 327 : 1115-1121
- 10) Haddow A, Alexander P : *An immunological method of increasing the sensitivity of human bronchogenic carcinoma cells by interferon beta. J Interferon Res.* 1984 ; 4 : 123-128
- 11) Milas L, Hunter N, Stone HB : *Corynebacterium paviium effect on radiocurability of murine tumors. Cancer Immunol.* 1978 ; 5 : 109-117
- 12) Saiki I, Milas L Hunter N : *Treatment of experimental lung metastassis with local thoracic irradiation followed by systemic activation with liposomes containing muramyl tripeptide. Cancer res.* 1986 ; 46 : 4966-4970
- 13) Tracey KJ : *The cytokine handbook, Tumor necrosis factor alpha. 2nd ed. London : Academic press,* 1994 : 289-304
- 14) Starnes HR, Warren RS, Jeevanandam M : *Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. J Clin Invest.* 1988 ; 82 : 321-325
- 15) Ostade XV, Vandenabele P, Everaerd B : *Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. Nature.* 1993 ; 361 : 266-269
- 16) Chung PS, Jeong PS : *Antitumor effect of Tumor Necrosis Factor- α . J Clinic Otolaryngol Head and Neck Surg.* 1996 ; 7(1) : 45-55
- 17) Zimmerman RJ, Chan A : *Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human TNF. Cancer.* 1989 ; 49 : 1644-1648
- 18) Zimmerman RJ, Marafino BJ : *The role of free radicals in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo implications for mechanisms of action. J Immunol.* 1990 ; 35 : 467-489
- 19) Hallahan DE, Beckett MA, Kufe D : *The interaction between recombinant human tumor necrosis factor and radiation in 13 human tumor cell lines. Int J Radi Oncol Biol Phys.* 1990 ; 19 : 69-74
- 20) Daila SG, Samanta NH, Boleslaw HL : *Tumor necrosis factor alpha augments radiation effects against human colon tumor xenograft. Anticancer res.* 1994 ; 14 : 1107-1112