

A-431 세포주의 방사선 및 항암제의 감수성에 관한 실험적 연구

홍성우, 최은숙, 고광준

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소

Experimental Study on the Radiosensitivity and Chemosensitivity of A-431 Cell Line

Seong-Woo Hong, Eun-Suk Choi, Kwang-Joon Koh.

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, and Institute
of Oral Bio Science, Chonbuk National University*

Objectives: The purpose of this study was to aid in the prediction of tumor cell tolerance to radiotherapy and/or chemotherapy.

Material and Methods: Human epidermoid carcinoma A-431 cell lines were irradiated by 2, 4, 6, 8, 10Gy at a dose rate of 210cGy/min using ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8 and then were exposed to bleomycin or cisplatin at concentration of 2 μ g/ml for 1 hour. The viable cells were determined for each radiation dose and/or each drug at the 4th day and cell surviving curves were obtained using semiautomated MTT assay.

Results: The surviving fraction after irradiation of 2Gy was 0.99, and there was not significant difference of surviving fraction in comparison with the control group on A-431 cell line(P > 0.05). But there were significant differences of surviving fractions at doses of 4, 6, 8, 10Gy in comparison with the control group(P < 0.05). The cytotoxicity of bleomycin or cisplatin was significantly different in comparison with the control group on A-431 cell line (P < 0.05). And the cytotoxicity of cisplatin was greater than that of bleomycin on A-431 cell line (P < 0.05). There were significant differences of surviving fractions after irradiation of 2, 4, 6, 8, 10Gy with bleomycin or cisplatin in comparison with each group of irradiation only on A-431 cell line(P < 0.05). There were significant differences of surviving fractions between the groups of irradiation with bleomycin and cisplatin at doses of 2, 4Gy(P < 0.05), but there were not significant differences of surviving fractions at doses of 6, 8, 10Gy on A-431 cell line (P > 0.05). (*J Korean Oral Maxillofac Radiol 1999;29:325-337*)

Key words : radiosensitivity, chemosensitivity, A-431 cell line

I. 서 론

구강암은 전체암의 3-5%¹⁾의 발생율을 보이며 우리나라에서는 연간 1,500명 내지 2500명의 구강암환자가 새로 발생하는 것으로 추정된다. 구강암은 구강점막상피에서 유래되는 편평세

포암종이 80%이상을 차지하며, 치아와 치아발생기 조직에서 유래되는 종양, 타액선조직에서 유래되는 종양 그리고 골, 림프구, 혈관, 신경 등의 결합조직에서 유래되는 육종들이 있다.

구강암의 치료는 외과적수술 또는 방사선조사를 이용한 단독치료, 외과적수술 또는 방사선

치료와 항암화학요법과의 병용치료에 의해 이루어지고 있다. 국소요법(local modality)으로는 외과적수술 또는 방사선조사를 이용한 단독치료, 초진시 원격전이가 있거나 국소치료 후 재발암인 경우에는 항암제를 이용한 전신요법(systemic modality)이 이용되어 왔다. 또한 항암화학요법을 이용하는 경우에는 항암제를 단일제제로 사용하기보다는 복합적으로 사용하는 복합화학요법(combination chemotherapy)이 시도되어 왔다. 한편 림프절을 침범하지 않은 T1N0와 T2N0의 초기암은 외과적수술 또는 방사선조사를 이용한 단독치료로서도 환자의 2년 생존율을 현저히 증가시킬 수 있게 되었으나 T3와 T4의 진행암은 외과적수술 또는 방사선치료와 함께 항암화학요법의 병용요법(combined modality)을 시행하여도 암환자의 2년 생존율은 15-30%²⁾로 보고되고 있다. 또한 초진시 또는 치료 후 경부 림프절전이가 의심되는 경우에는 의심되지 않은 경우보다 암환자의 2년 생존율은 반으로 감소되는 것으로 보고되고 있다³⁾.

암환자의 방사선치료시에는 암조직의 방사선감수성, 조직병리학적 특성, 종양의 부위 및 범위, 전이여부 등을 평가하여야 하며 암조직 주위 정상조직의 손상을 최소화시키면서 암조직을 파괴시켜야 한다. 또한 방사선치료시 암조직의 방사선감수성은 암환자치료 후 국소제어율을 예측하는데 이용될 수 있으며⁴⁾ 암조직의 방사선감수성은 그것이 유래하는 정상조직의 방사선감수성에 크게 의존된다⁵⁾. 일반적으로 암세포의 방사선감수성은 그것이 유래하는 정상조직의 방사선감수성보다 높아 방사선치료가 가능하다. 림프조직으로부터 발생하는 악성림프종등은 높은 방사선감수성을 나타내고 구강점막상피로부터 유래되는 편평세포암종은 중등도 이상의 방사선감수성을 보인다. 반면 타액선조직으로부터 유래되는 선암종, 점막유표피종양 등은 중등도보다 약간 낮은 방사선감수성을 보이며 결합조직으로부터 발생하는 골육종, 근육종 등은 낮은 방사선감수성을 나타낸다. 일반적으로 편평세포암종은 방

사선감수성이 중등도 이상으로서, 일부 방사선감수성이 낮은 종양을 제외하고는 60Gy/6주의 방사선량으로 이의 국소제어가 가능하다.

항암화학요법을 시행하는 경우에는 항암제의 작용기전이 명확히 규명되고 항암제감수성이 높은 항암제를 선택함으로써 암치료효과를 높일 수 있다. 항암화학요법에 이용되는 항암제의 종류는 작용기전에 따라 항암성항생물질군, 알킬화제군, 대사길항제군, 스테로이드호르몬군, 유사분열억제제군, 기타군으로 대별되며 bleomycin은 항암성항생물질군, cisplatin은 알킬화제군으로 분류된다.

항암화학요법은 전신요법으로서 구강암환자 중 초진시 원격전이가 있거나 국소치료 후의 재발암환자에게 고식적으로 이용되어 왔으나 1980년대 초 구강암치료에 cisplatin의 효과가 보고된 후 항암화학요법의 이용이 더욱 활발하게 되었다⁶⁾. 또한 항암화학요법을 시행하는 경우에는 항암제를 단독투여하는 것보다 복합투여함으로써 항암효과가 항진됨이 보고되면서 복합화학요법이 시도되었다⁷⁾. 복합화학요법에는 cisplatin을 주체로 한 5-FU(fluorouracil), bleomycin, methotrexate, vinblastine, mitomycin C 등의 항암제가 이용되고 있다. 그러나 아직 구강암에 대한 복합화학요법 단독치료로는 완전관해에 이르지 못하고 있는 실정이다. 따라서 최근 구강암치료시에는 항암화학요법과 외과적수술 또는 방사선조사를 이용한 병용치료가 많이 이용되고 있다. 즉 외과적수술이나 방사선치료 전에 먼저 항암화학요법을 시행하는 유도화학요법 또는 선행화학요법이 이용되거나 외과적수술 후 보조화학요법이 이용되고 있다.

방사선감수성에 관한 연구로는 Geara등⁸⁾, Wurm등⁹⁾, Dittmann등¹⁰⁾, Areltt와 Harcourt¹¹⁾, Peters¹²⁾, 고¹³⁾ 등의 인체 정상세포에 대한 연구, Hall등¹⁴⁾, Malaise등¹⁵⁾의 인체 정상세포와 암세포주에 대한 연구, 그리고 清水¹⁶⁾, Mathews¹⁷⁾, Stuschke¹⁸⁾, Girinsky¹⁹⁾, Kwok과 Sutherland²⁰⁾, Weichselbaum⁴⁾, 고²¹⁾ 등의 인체 암조직으로부터

분리시킨 암세포주에 대한 연구 등이 있다. 1956년 Puck와 Marcus²²⁾가 HeLa세포에 방사선조사 후 세포생존곡선(dose response curve)을 작성한 이래 방사선감수성 연구에 이 생존곡선이 이용되고 있다. Fertil과 Malaise²³⁾ 그리고 Deacon등²⁴⁾은 세포주에 방사선조사 후 2Gy 방사선량에서의 세포생존율(SF2)이 암세포의 고유방사선감수성을 나타내며 이는 그 세포주의 방사선감수성을 결정하는데 중요한 척도가 된다고 보고하였다. 또한 清水¹⁶⁾는 인체 구강저암 KB세포주에 방사선조사 후 얻은 세포생존곡선에서 2Gy의 방사선량에서 세포생존곡선의 기울기가 작아 방사선감수성이 비교적 낮다고 하였다. 또한 고등²¹⁾은 인체 상피암세포주를 대상으로 한 연구에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 대하여 보고한 바 있다.

항암제감수성에 관한 연구로는 Drewinko등²⁵⁾, Park등²⁶⁾, Carmichael등²⁷⁾, Schroyens등²⁸⁾, Takahara²⁹⁾, Nio등³⁰⁾, Pu등³¹⁾, Fujisaki등³²⁾의 보고가 있다. 또한 Ensley등³³⁾, Chang등³⁴⁾, Pekkola등³⁵⁾은 두경부 편평세포암종의 항암화학요법과 방사선치료의 항암효과에 대하여, Carmichael과 Hickson³⁶⁾은 항암제와 방사선의 세포내성의 작용기전에 대하여 각각 연구한 바 있으며, Rooney 등³⁷⁾, Rozenzweig등⁷⁾은 두경부 악성종양에 대한 복합화학요법의 효과를 보고하였다. 또한 Al-Sarraf등³⁸⁾, Jaulerry등³⁹⁾은 두경부암에 대한 유도화학요법의 효과, 清水¹⁶⁾는 인체 구강저암 KB세포주에 대한 방사선과 항암화학요법의 병용효과에 대하여 보고한 바 있다. 한편 국내에서 최와 고⁴⁰⁾는 YAC-1 세포주의 방사선 및 항암제감수성에 관한 연구, 심과 이⁴¹⁾는 인체 종양세포주에 대한 인터페론의 시험관내 및 생체내 항암효과, 이등⁴²⁾은 인체 암세포주의 MDR1 유전자발현도와 항암제감수성에 대하여 보고한 바 있다.

암세포주에 대한 세포독성을 검사하는 방법으로 시험관내 검색법으로는 dye exclusion assay(DEA)⁴³⁾, human tumor clonogenic assay(HTCA)⁴⁴⁾, Radioassay⁴⁵⁾, sulforhoda-

mine B(SRB) assay⁴⁶⁾, bichinchoninic acid (BCA) assay⁴⁷⁾, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2, -yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 등이 이용되고 있다.

지금까지 암세포주에 대한 방사선 단독조사 또는 항암제 단독투여시 세포독성에 관한 연구는 활발하게 진행되어 왔으나 이들의 병용에 대한 연구는 드문 실정이다.

본 연구는 인체 유포피암 A-431 세포주에 대한 방사선 단독조사, 항암제 단독투여 그리고 방사선조사 직후 항암제를 투여하고 각각의 세포독성을 평가한 것으로서 향후 두경부암 환자의 치료시 치료반응을 예측할 수 있는 기초자료를 얻는데에 그 목적이 있다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 연구재료

(1) 암세포주

Human epidermoid carcinoma A-431 세포주를 10% D-FBS(Fetal Bovine Serum (M.A. Bioproducts, Walkersville, MD))와 streptomycin, penicillin이 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. A-431 세포주를 96 well plate에 3 \times 10⁴ cells/ml 되도록 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, 실험기간 중에는 -70 $^{\circ}$ C 냉암소에 보관하였다. 실험에 사용한 약제의 농도는 2 μ g/ml이었다.

2. 연구방법

(1) 방사선 단독조사

A-431 세포주에 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8을 이용하여 선량을 210 cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10Gy를 단회조사하였으며, 촛점-시험관거리는 60Cm, 조사야는 15×20 Cm²이었다.

(2) 항암제 단독투여

A-431 세포주에 2 μ g/ml의 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여하였다.

(3) 방사선조사 후 항암제투여

방사선조사 직후 2 μ g/ml 농도의 bleomycin 또는 cisplatin이 함유된 배양액에 A-431 세포를 넣어 현탁액을 만들고 온도 37 $^{\circ}$ C, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂ 배양기에 1시간 정지한 후 동일한 방법으로 2회 원침하여 항암제를 세척하였다. 96 well plate에 RPMI배양액 2ml를 혼합하고 상기 조건하의 배양기에서 암세포주를 4일간 배양한 후 실험에 적절한 세포주의 증식을 확인하였다.

(4) MTT 측정

A-431 세포주는 흡광도 측정 4시간 전에 MTT 5 μ g/ml가 혼합된 배양액을 각 well당 200 μ 씩 넣어 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 DMSO를 100 μ /well씩 넣어 15분간 실온에 정지한 후, 세포내 형성된 MTT formazan product를 용해하여 분광광도계 540nm에서 용

해된 MTT의 흡광도를 scanning multiwell spectrophotometer (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay Reader: Biotek Instruments, Inc. Burlington, VT)로 측정하여 세포생존율을 구하고 이를 대조군과 비교하였으며, 모든 실험은 3번 반복하였다.

III. 연구성적

1. 대조군

A-431 세포주는 분주 후 well plate 기저면에서 느리게 성장하였다. MTT분석에서 방사선 단독조사군 또는 bleomycin, cisplatin 단독투여군의 4일째 A-431 세포주의 최적밀도(optimal density)는 1.38 \pm 0.00(3 \times 10⁴cells/ml)이었다 (Table I, II).

2. 실험군

(1) 방사선 단독조사군

방사선조사 후 4일째 A-431 세포주는 2, 4, 6, 8, 10Gy의 각 조사군에서 세포생존율을 백분율로 환산하였을 때 0.99-0.58의 범위를 보였고, 2Gy의 방사선량에서는 세포생존율의 백분율이 0.99이었으며 대조군과 세포생존율의 차이가 없었으나(P > 0.05), 4, 6, 8, 10Gy의 방사선량에서는 대조군과 유의한 세포생존율의 차이가 있었

Table I. Radiation Surviving Fraction of A-431 Cell Line in MTT assay

Radiation Dose	Surviving Fraction (Mean \pm S.D.)	Ratio (Experimental/Control)
Control	1.38 \pm 0.00	1
2Gy	1.36 \pm 0.00	0.99
4Gy	1.31 \pm 0.02*	0.95
6Gy	1.15 \pm 0.02*	0.83
8Gy	0.93 \pm 0.03*	0.67
10Gy	0.80 \pm 0.01*	0.58

* Significantly different by DUNCAN test (P < 0.05)

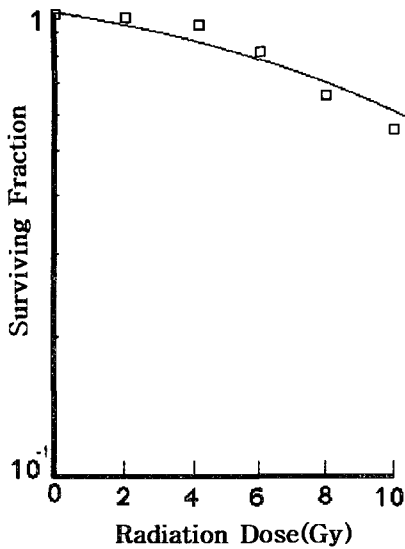


Figure 1. Radiation Surviving Fraction of A-431 Cell Line in MTT assay

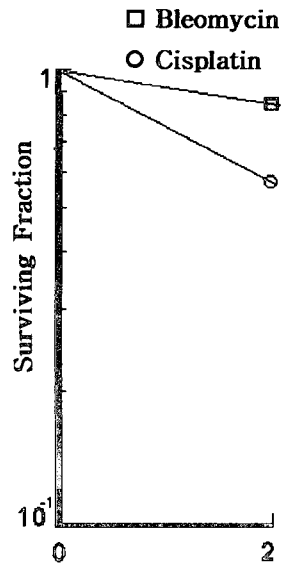


Figure 2. Effect of Antitumor drugs on A-431 Cell Line in MTT assay

Table II. Effect of Antitumor Drugs on A-431 Cell Line in MTT assay

Drug	Surviving Fraction (Mean±S.D.)	Ratio (Experimental/Control)
Control	1.38±0.00	1
Bleomycin	1.23±0.04*	0.89
Cisplatin	0.79±0.09*	0.57

* Significantly different by DUNCAN test (P<0.05)

다(Table I, Figure 1, P<0.05).

(2) 항암제 단독투여군

A-431 세포주에 2 μ g/ml의 bleomycin 또는 cisplatin을 각각 단독투여한 경우 세포생존율을 백분율로 환산하였을 때 대조군에 비하여 각각 0.89, 0.57이었다. 또한 bleomycin 또는 cisplatin 투여군과 대조군의 세포독성의 차이가 있었으며, cisplatin 투여군에서의 세포독성이 bleomycin 투여군에서의 것보다 더 컸다(Table II, Figure 2, P<0.05).

(3) 방사선조사 후 항암제투여군

A-431 세포주에 방사선조사와 2 μ g/ml의 bleomycin 투여를 병용한 경우, 방사선 단독조사군과 비교하여 세포생존율은 백분율로 0.75-

0.67의 범위를 보였고, 2, 4, 6, 8, 10Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었다(Table III, Figure 3, P<0.05). 또한 A-431 세포주에 방사선조사와 2 μ g/ml의 cisplatin 투여를 병용한 경우는, 방사선 단독조사군과 비교하여 세포생존율이 백분율로 0.78-0.57의 범위를 보였으며, 2, 4, 6, 8, 10Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었다(Table III, Figure 4, P<0.05).

한편 방사선조사와 2 μ g/ml의 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 경우는 2, 4Gy의 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었으나(P<0.05), 6, 8, 10Gy의 방사선량에서는 두 군사이의 세포생존율의 차이가 없었다(P>0.05).

Table III. Effect of Radiation and Antitumor Drugs on A-431 Cell Line in MTT assay

(Mean±S.D.)

Radiation Dose	Radiation Only	Radiation+ Bleomycin(2 ⁺)	Ratio	
	Surviving Fraction	Surviving Fraction	(Experimental/Radiation)	(Experimental/Radiation)
2Gy	1.36±0.00	1.02±0.04*	0.75	0.77±0.03*
4Gy	1.31±0.02	0.88±0.03*	0.67	0.75±0.03*
6Gy	1.15±0.02	0.78±0.06*	0.68	0.74±0.03*
8Gy	0.93±0.03	0.65±0.12*	0.70	0.70±0.04*
10Gy	0.80±0.01	0.60±0.08*	0.75	0.62±0.07*

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

* Significantly different by DUNCAN test ($P<0.05$)

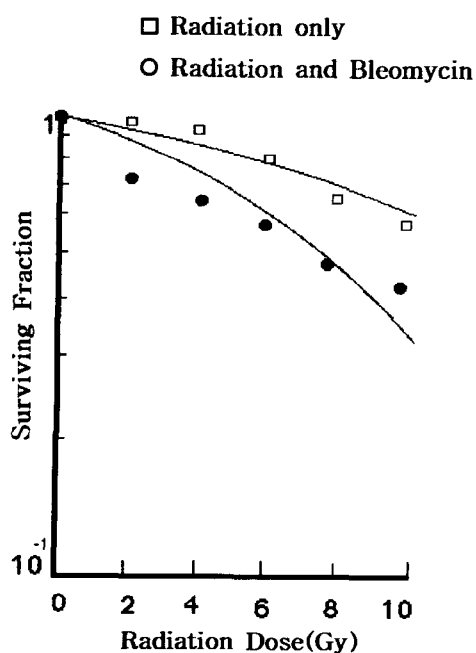


Figure 3. Effect of Radiation and Bleomycin on A-431 Cell Line in MTT assay

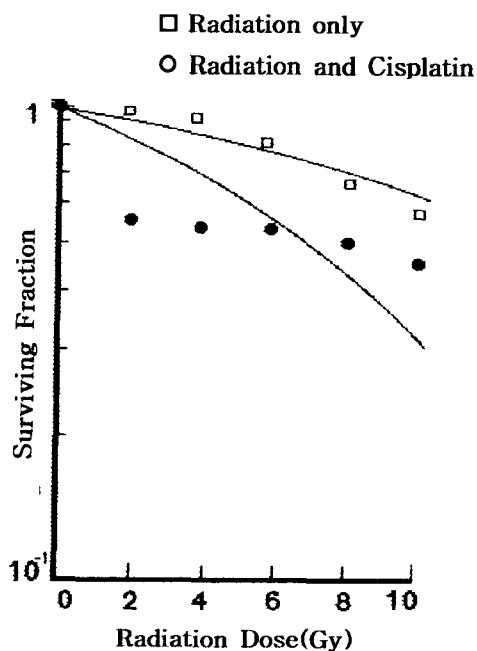


Figure 4. Effect of Radiation and Cisplatin on A-431 Cell Line in MTT assay

IV. 총괄 및 고안

일반적으로 암세포의 방사선감수성은 임상반응을 나타내는 지표가 될 수 있고 암세포주의 방사선감수성 실험은 암환자치료 후의 생존율을 예측하는데 이용될 수 있다⁴⁾. 따라서 암환자에게 방사선치료를 시행하기 전 그 치료결과를 예측하고 치료효과를 높이기 위하여 암조직으로부터 암세포를 분리하고 이의 방사선감수성을 미리 평가하는 실험이 이루어졌다²⁰⁾. 그러나 실제 환자로부터 생검한 조직에서 정상세포와 암세포를 분리하고 분리된 암세포를 적절한 조건하에서 배양하는 데에는 많은 어려움이 있으므로 계대배양한 암세포주를 대상으로 실험실에서 적절한 배양조건하에서 방사선감수성 실험이 이루어지게 되었다.

실험실에서 섬유모세포주의 방사선감수성에 대하여 Burnett등⁵¹⁾은 방사선치료 후 인체 정상조직의 급성반응과는 밀접한 관계가 있다고 하였으나, Geara등⁵⁾은 방사선치료 후 정상조직의 급성반응과 상관관계가 없고 만성반응과 관련성이 크다고 하였다. Wurm등⁵²⁾은 인체 섬유모세포에 방사선을 조사하고 회복시간 경과 후 잔존 DNA손상(residual damage)의 양과 세포생존율과는 관련성이 크다고 보고하였다. 즉 방사선이 세포에 작용하면 DNA손상이 일어나며 이 결과 세포사, 염색체 이상, 발암변이 등이 발생할 수 있다.

방사선치료시에는 총방사선량을 단회조사하는 것보다 분할조사하는 것은 저선량을 장기간 조사함으로써 정상조직은 방사선손상으로 보되 회복을 기대하고 암세포의 파괴는 증가시킬 수 있기 때문이다⁵⁾. 임상적으로 환자의 상태에 따라 15일간 방사선조사를 중지해야 될 경우 총방사선량은 10%정도 증가시킬 필요가 있다. 이와같이 방사선생물학적 관점에서 분할조사시에는 분할조사 간격 내에 일어나는 조직세포의 준치사손상으로부터의 회복이 암조직보다 정상조직에서 현저하고 세포분열과정에서의 재분포, 재군집화

및 종양세포에서 일어나는 재산소화로 인하여 방사선효과가 증대된다¹³⁾. 한편 임상적인 면에서 볼 때 암조직 크기감소의 빠르기는 방사선감수성과 상관관계가 있으나 반드시 방사선치료 가능성을 의미하지는 않는다.

항암제감수성 실험결과와 임상치료 결과와의 상관관계에 대해서는 다양하게 보고되고 있다. Bogden등⁵²⁾은 인체 충실성종양(solid tumor)을 대상으로 마우스 신피막하이식법(subrenal capsule assay)을 시행하여 항암제의 임상예측적중도를 85%로 보고한 바 있다. 또한 항암화학요법에 의한 암조직크기의 감소는 방사선감수성이 있는 암조직을 알아내는 데에도 도움이 된다. 한편 Schroyens²⁰⁾는 항암제감수성 실험과 항암화학요법 시행결과의 상관관계에 대하여 내성예견에는 높은 상관관계가 있었으나 감수성예견에는 상관관계가 낮았다고 하였다.

암세포의 방사선 또는 항암제의 세포독성을 평가하기 위하여 세포생존곡선을 이용한 연구가 활발히 진행되어 왔다. Peacock⁵³⁾, Hall등¹⁴⁾은 세포생존곡선에서 그 기울기가 방사선감수성과 밀접한 관련이 있으며 그 기울기가 클수록 방사선감수성이 높다고 하였다. 따라서 세포생존곡선의 기울기를 평가함으로써 암환자의 치료결과를 예측해볼 수 있다. Fertile과 Malaise²⁰⁾는 세포생존곡선에서 2Gy 방사선량에서의 세포생존율이 세포주에 대한 방사선감수성을 결정한다고 보고하였다. Brock등⁵⁴⁾은 두경부 편평세포암환자를 대상으로 방사선치료 전 생검한 조직으로부터 배양한 세포주에 방사선조사 후 2Gy 방사선량에서의 세포생존율과 방사선치료 후 결과와의 상관관계는 0.11-0.91로서 다양하였으나 0.4이상인 경우는 0.3이하인 경우보다 재발가능성이 높다고 하였다.

본 연구에서 A-431 세포주에 대한 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사한 경우 방사선량이 증가될수록 세포생존율은 감소되었고 2Gy 방사선량에서의 세포생존율은 0.99를 나타내었으며 대조군과 유의한 세포생존율의 차이는 없었

다. 그러나 4, 6, 8, 10Gy의 방사선량에서는 대조군과의 차이가 있었다. 또한 세포생존율을 백분율로 환산했을 때 0.99 - 0.58로서 세포생존곡선의 기울기는 완만하였다. 따라서 A-431세포주는 방사선감수성이 비교적 낮은 것으로 사료되며 이와같은 연구결과는 유평피암종의 방사선감수성이 중등도보다 약간 낮다는 선학들의 연구결과와도 유사하다.

구강암치료시 사용되어온 항암제는 bleomycin, 5-FU등이 항암제로서 상용되어 왔으나 cisplatin의 개발과 선행화학요법에 의해 항암화학요법의 많은 발전이 이루어졌다. 또한 항암제 투여시 복합화학요법으로 치료하는 경우에는 cisplatin-5FU가 주로 이용되고있다. Kish등⁵⁵⁾은 cisplatin과 5-FU는 각각 단일제제로써 30 - 40%의 환자에서 관해를 유도할 수 있고 이 두 약제는 상승효과가 있다고 하였으며 5-FU를 계속 주입시 bolus투여에 비해 그 골수독성이 약하여 더 많은 양의 약제투여가 가능하므로 보다 큰 항암효과를 얻을 수 있다고 보고하였다. 1987년 Murthy등⁵⁶⁾은 수술이 불가능한 두경부암환자와 재발암환자 44례에 대하여 cisplatin-5FU를 방사선조사와 병용치료한 결과 1차 국소제어율이 98%, 2년 후 87%의 국소제어율을 보고하면서 이 치료법이 국소제어율을 현저히 증가시킬 수 있다고 하였다. 이외에 사용되는 항암제로는 methotrexate, vinblastine, mitomycin C 등이 있으며 이들의 효과에 대해서는 많은 보고가 있다. bleomycin은 수용성 당펩타이드로서 두경부, 피부, 폐 등의 편평세포암종의 치료에 효과가 큰 것으로 알려져 있으며 이는 암세포에 작용하여 DNA합성을 방해하고 DNA사슬의 절단을 일으키며 세포주기 중 특히 G₂기에 감수성이 높다. 한편 cisplatin은 단일제제 투여시 다른 항암제보다 항암효과가 더 큰 것으로 알려져 있고 암세포에 작용하여 세포주기 중 DNA합성방해와 DNA사슬 사이에 교차를 형성한다⁶⁾.

清水등¹⁶⁾은 30Gy의 방사선조사와 90mg의 bleomycin투여에 의해 T1과 T2의 초기암에서는

높은 치료반응이 있었으며 T3의 진행암에서도 높은 치료반응과 국소제어율이 있었다고 하였다. Al-Sarraf등³⁸⁾은 선행화학요법에 실패한 두경부암환자에게 방사선치료와 cisplatin투여를 병용하여 좋은 치료결과를 얻었으며 Smid등⁵⁷⁾도 bleomycin 및 mitomycin C투여와 방사선치료를 병용한 경우 방사선 단독치료시보다 항암효과가 더 컸다고 하였다.

본 연구에서는 예비실험을 시행하여 A-431세포주에 대한 적절한 세포수를 결정하였다. 또한 적절한 항암제농도를 구하기 위하여 0.2, 2, 20 μ g/ml의 항암제농도를 이용하였고 이 중 가장 실험에 적절한 최고혈중농도인 2 μ g/ml의 항암제농도를 본 실험에 이용하였다. A-431세포주에 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여한 경우 세포생존율이 각각 0.89, 0.57로서 대조군과 세포생존율의 차이가 있었다. 이는 A-431세포주에 항암제를 단독투여시 bleomycin보다 cisplatin의 세포독성이 큰 것으로 사료되며 이 결과는 선학들의 연구결과와 일치된다.

또한 A-431세포주에 방사선을 단독조사한 경우보다 방사선조사와 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 경우 모든 군에서 세포독성이 더 크게 나타났다. 이러한 본 연구결과는 항암제의 세포독성과 함께 방사선조사 후 일어나는 A-431세포의 준치사손상으로부터의 회복이 방해를 받았기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 본 실험에서 방사선조사와 bleomycin을 병용한 경우와 방사선조사와 cisplatin을 병용한 경우 두 군 사이의 세포생존율은 2, 4Gy의 방사선량에서만 차이가 있었다. 이러한 실험결과는 방사선 단독조사시보다 항암제투여와 병용치료한 경우 세포독성이 더 크다는 선학들의 연구결과와 일치된다. 한편 병용치료하는 경우 저선량 방사선량에서는 cisplatin이 bleomycin보다 세포독성이 크나 방사선량이 증가되면 이들 병용치료효과의 차이는 적을 것으로 사료된다.

항암화학요법을 시행하는 경우에는 방사선치료 전 또는 후에 시행할 수 있으며 최근에는 항암

화학요법을 시행한 후 방사선조사를 병용하는 유도화학요법이 큰 치료효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 유도화학요법은 원발성 암의 국소제어율의 증가를 기대할 수 있으며 암조직의 크기를 감소시켜 외과적수술을 용이하게 하고 방사선감수성이 높은 암조직의 예견에도 도움을 줄 수 있다는 장점이 있으며 진행된 두경부암환자의 30 - 50%에서 나타날 수 있는 미세전이의 초기 치료를 가능하게 한다⁵⁸⁾. 특히 cisplatin은 방사선조사 전 투여함으로써 부가효과를 기대할 수 있는 것으로 알려져 있다. Leliveld등⁵⁹⁾은 방사선조사 전 cisplatin을 투여하였을 때 더 큰 항암효과를 나타내었다고 보고하였다. 한편 유도화학요법은 정상조직의 손상을 증가시킬 수 있으며 방사선치료 후 나타나는 점막염이나 피부변화를 증가시킬 수 있다는 단점이 있다. 항암화학요법의 효과에도 불구하고 많은 부작용이 수반될 수 있는데 bleomycin은 투여량의 증가에 의해 알러지 반응 또는 폐독성을 일으킬 수 있고 cisplatin은 오심, 구토, 청각손상 및 신독성을 야기할 수 있어 장기간 또는 효과적인 용량까지의 투여에는 어려움이 있다⁷⁾.

지금까지 방사선조사 또는 항암화학요법의 단독치료보다 이들의 병용요법이 암치료효과를 증가시킬 수 있다는 많은 보고가 있지만 아직 방사선조사시의 총조사량, 조사방법 그리고 항암제 투여시의 투여량, 시행횟수 등에 있어 다양한 시도가 이루어지고 있는 실정이다. 따라서 개개 암환자에 대한 최선의 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

본 연구에서는 A-431 세포주에 방사선조사 직후 체외반응에 비교적 안정성이 있는 항암제로 알려진 bleomycin과 cisplatin을 각각 투여하였다. 향후 bleomycin 또는 cisplatin의 방사선증강효과 또는 부가효과를 평가하기 위해서는 방사선조사 전후의 항암제의 세포독성이 체계적으로 연구되어야 할 것으로 사료된다.

MTT분석법은 세포독성을 정량적으로 평가할 수 있으며 신속하고 재현성이 높은 분석법으

로 세포독성평가시 많이 이용되고 있다⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

본 연구에서도 MTT분석법을 이용하여 세포독성을 평가하였으며 spectrophotometer로 흡광도 측정시 540nm의 흡광도를 이용하였다.

본 연구는 인체 유포피암 A-431세포주에 대하여 방사선 단독조사, 항암제 단독투여 그리고 방사선조사 직후 항암제를 병용투여하고 이들의 세포독성을 평가하였다.

향후 방사선 단회조사와 분할조사시의 비교 연구, 방사선 및 항암제의 세포독성을 증가시킬 수 있는 다른 약제들 특히 생약제제들에 대한 연구도 이루어져야 할 것으로 사료된다. 최근 분자생물학, 세포생물학 및 면역학 등의 발달에 의해 암이 세포의 유전자적 이상에 기인하는 것으로 밝혀지고 있으므로 새로운 개념의 암치료법의 개발이 요구되고 있다. 따라서 암환자의 생존율을 증가시키기 위해서는 방사선 또는 항암제에 높은 내성을 나타내는 암세포들의 내성기전이 명확히 구명되어야 하며 외과적수술, 방사선치료, 항암화학요법과 함께 유전자치료, 면역치료 등의 새로운 암치료법의 개발이 필요하다고 사료된다.

V. 결론

방사선 및 항암제의 세포독성을 알아보기 위하여, 실험실에서 배양된 human epidermoid carcinoma A-431 세포주를 대상으로 방사선 단독조사군은 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사하였으며, 항암제 단독투여군은 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여하였다. 또한 방사선조사와 항암제를 병용한 경우에는 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사한 직후 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 투여하였다. 각각의 실험방법에 따른 세포생존율을 구하고 세포생존곡선을 작성한 후 세포독성을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. A-431 세포주에 2Gy의 방사선을 단독조사한 경우 세포생존율은 0.99이었으며, 대조군과 유의한 세포생존율의 차이는 없었다(P >

- 0.05). 그러나 4, 6, 8, 10Gy의 방사선량에서는 대조군과 유의한 세포생존율의 차이가 있었다($P < 0.05$).
2. A-431 세포주에 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여한 경우 대조군과 유의한 세포생존율의 차이가 있었고, cisplatin이 bleomycin보다 세포독성이 더 컸다($P < 0.05$).
 3. A-431 세포주에 방사선조사와 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 경우 방사선을 단독조사한 경우에 비하여 2, 4, 6, 8, 10Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었다($P < 0.05$).
 4. A-431 세포주에 방사선조사와 bleomycin 또는 cisplatin을 병용한 경우 2, 4Gy의 방사선량에서는 두 군사이의 세포생존율의 차이가 있었으나($P < 0.05$), 6, 8, 10Gy의 방사선량에서는 두 군사이의 세포생존율의 차이는 없었다($P > 0.05$).

참 고 문 헌

1. Lee SK et al : Malignant tumors among Koreans-relative frequency study on 19,140 cases during 1978 to 1986. *Journal of Korean Medical Science* 1988, 3(1):1-12.
2. Glick JH, Marcial V, Richter M, 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. *Cancer* 1980, 46:1919-1924.
3. Kim JC, Park IK : Comparison of the result of radiation alone and chemoradiation in cervical cancer. *J Korean Soc Ther Radiol* 1995, 13(2):191-198.
4. Weichselbaum RR, Epstein J, Little JB : In vitro cellular radiosensitivity of human malignant tumors. *Europ J Cancer* 1976, 12:47-51.
5. 足立忠 : 放射線學, 第 7版. 醫學書院, 1979, pp.289-292
6. 김문중 : 암화학적요법, 서광의학서림 1991, pp.43-48.
7. Rozenzweig M, Donion P, Bruntsch U, Gallmeier W, Clavel M, Gignoux B et al : Combination chemotherapy with cisplatin, methotrexate, bleomycin, and vincristine in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1984, 54: 1499-1503.
8. 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* 1993, 27:1173-1179.
9. 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* 1994, 30:625-633.
10. Dittmann K, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP : Bowman-Birk proteinase (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radiother Oncol* 1995, 34:137-143.
11. Arlett CF, Harcourt SA : Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Research* 1980, 40:926-932.
12. Peters LJ : Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cell as a predictor of human tumor response. *Radiotherapy and Oncology* 1990, 17:177-190.
13. 고병희, 함창곡, 김정진 : 단일조사와 분할조사시 마우스공장 소낭세포의 방사선효과에 관한 실험적 연구. *대한치료방사선학회지* 1985, 3:1-8.
14. 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* 1986, 12:655-659.
15. Malaise EP, Deschayanne PJ, Fertil B : The relationship between potentially lethal

- damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells. *Int J Radiat Biol* 1989, 56(5):597-604.
16. 清水谷公成 : ヒト口腔癌由来 KB細胞におけるX線とヘフレオマイシンの併用効果. 齒放 1986, 25:232-238.
 17. Matthews JHL, Meeker BE, Chapman JD : Response of human tumor cell lines in vitro to fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989, 16:133-138.
 18. Stuschke M, Budach V, Stuben G, Streffer C, 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* 1995, 32:395-408.
 19. Girinsky T, Lubi R, Pigno JP, Chavaudra N, Gazeau J, Dubray B et al : Predictive value of in vitro radiosensitivity parameters in head and neck cancers and cervical carcinomas : preliminary correlations with local control and overall survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993, 25:3-7.
 20. Kwok TT, Sutherland RM : The influence of cell-cell contact on radiosensitivity of human squamous carcinoma cells. *Radiation Research* 1991, 126:52-57.
 21. 高경환, 하성환, 박찬일 : 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구. 대한치료방사선학회지 1993, 11:17-27.
 22. Puck TT, Marcus PI : Action of X-rays on mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1956, 103:653-667.
 23. Fertl B, Malaise EP : Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981, 7:621-629.
 24. Deacon J, Peckham MJ, Steel GG : The radioresponsiveness of human tumors and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 1984, 2:317-323.
 25. Drewinko B, Patchen M, Yang LY, Barlogie B : Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferation and nonproliferating human tumor cells. *Cancer Research* 1981, 41:2328-2333.
 26. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF : Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Research* 1987, 47:5875-5879.
 27. Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE : Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer* 1988, 57:540-547.
 28. 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* 1990, 26:834-838.
 29. Takahara T : Growth chamber assay, a chemosensitivity test to eliminate normal stromal cells. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1995, 96:59-71.
 30. Nio Y, Tamura K, Tsubono M, Kawabata K, Masai Y, Hayashi H, Ishigami SI : Anticancer chemosensitivity changes between the original and recurrent tumors after successful chemotherapy selected according to the sensitivity assay. *Annals of Surgery* 1995, 221:89-99.
 31. Pu YS, Hsieh TS, Tsai TC, Cheng AL, Hsieh CY, Su IJ, Lai MK : Tamoxifen enhances the chemosensitivity of bladder carcinoma cells. *J Urology*, 1995, 154:601-605.
 32. Fujisaki T, Wada T, Takahashi M, Yamawaki S, Ishii S : In vitro chemosensitivity assay for human osteosarcoma using tumor xenografts. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995, 313:279-285.
 33. Ensley JF, Jacobs JR, Weaber 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* 1984, 54:811-814.

34. Chang H : Radiosensitization of cis-platinum in the treatment of advanced head and neck squamous cell carcinoma. *J Korean Soc Ther Radiol* 1992, 10(1):27-34.
35. Pekkola HK, Jaakkola M, Kulmala J, Grenman R : Comparison of cellular radiosensitivity between different localizations of head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995, 121:452-456.
36. Carmichael J, Hickson ID : Keynote address : Mechanisms of cellular resistance to cytotoxic drugs and X-radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991, 20:197-202.
37. Rooney M, Kish J, Jacobs J : 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* 1985, 55:1123-1128.
38. Al-Sarraf M, Pajak TF, Macri VA, Mowry P, Cooper JS, Stetz J et al : Concurrent radiotherapy and chemotherapy with cisplatin in inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1987, 59:259-265.
39. Jaulerry C, Rodriguez J, Brunin F, Jouve M, Mosseri V, Point D et al : Induction chemotherapy in advanced head and neck tumors : results of two randomized trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992, 23:483-489.
40. 최의환, 곽광준 : YAC-1 세포주의 방사선 및 항암제감수성에 관한 실험적 연구. *치과방사선* 1997, 27(1):43-53.
41. 심우남, 이원영 : 사람종양 세포주에 대한 rHu IFN- α A의 시험관내 및 생체내 항암효과. *대한면역학회지* 1987, 9:249-257.
42. 이경영, 박재갑, 아디가즈다, 로리 골드스타인, 황이숙, 김진복 : 인체암세포주의 MDR1 유전자 발현도와 항암제감수성에 관한 연구. *J of Korean Cancer Association* 1990, 22(1):37-47.
43. Weisenthal LM, Morsden JA, Dill PL, Macaluso CK : A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res* 1983, 43:749-757.
44. Hamburger AW, Salmon SE : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977, 197:461-463.
45. Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y, Morton DL : Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res* 1982, 42: 2159-2164.
46. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D et al : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82:1107-1112.
47. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Annals Biochem* 1985, 150:76-85.
48. Campling BG, Pym J, Galbraith PR, Cole SPC : Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blastic cells. *Leukemic Research* 1988, 12:823-831.
49. Sasaki F, Ishimura H, Takada N, Uchino J : Chemosensitivity test for thyroid cancer by in vitro MTT assay. *Gan To Kagaku Ryoho* 1995, 22:1771-1781.
50. 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* 1995, 9:1864-1869.
51. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurn R, Yarnold JR, Peacock JH : Prediction of normal tissue tolerance to radiotherapy from in vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 1992, 339:1750-1751.
52. Bogden AE, Griffin W, Reich D : Cancer treatment review 11(Suppl A) : 1984, 113-124.
53. Peacock JH, Eady JJ, Edwards S, Holmes A, McMillan TJ, Steel GG : Initial damage or repair as the major determinant of

- cellular radiosensitivity? *Int J Radiat Biol* 1989, 56(5):543-547.
54. Brock WA, Baker FL, Wike JL, Sivon SL, Peters LJ : Cellular radiosensitivity of primary head and neck squamous cell carcinoma and local tumor control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990, 18:1283-1286.
 55. Kish S, Drelichman A, Jacobs J : Cancer treat rep 1982, 66:471-474.
 56. Murthy AK, Taylor SG, Showel J, Caldrelli DD, Hutchinson JC, Holinger LD et al : Integration of chemotherapy into the combined modality therapy of head and neck squamous cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987, 13:1807-1813.
 57. Smid L, Lesnicar H, Zakotnik B, Soba E, Budihna M, Furlan L et al : Radiotherapy, combined with simultaneous chemotherapy with mitomycin C and bleomycin for inoperable head and neck cancer-preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995, 32:769-775.
 58. 방영주, 윤성수, 박근철, 이재훈, 김승택, 김노경 외 : 국한성 진행 두경부 악성종양(편평상피암)에 대한 선행화학요법 및 방사선요법의 병용치료 효과. *대한치료방사선학회지* 1988, 20(1):82-89.
 59. Lelieveld P, Scoles MA, Brown JM, Kallman RF : The effect of treatment in fractionated schedules with the combination of X-radiation and six cytostatic drugs on the RIF-1 tumor and normal mouse skin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985, 11:111-121.
 60. Budd GT, Groppe CW : Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Cancer* 1983, 51:589-590.
 61. Koh KJ, Ikeda H, Shimizutani K, Inoue T, Furukawa S, Fuchihata H : A preliminary and clinical study of radiation therapy for tongue carcinoma. *Oral Radiol* 1992, 8(1):1-9.
 62. Fletcher GH : *Textbook of radiotherapy*. Lea and Febiger, 1980, pp.105-175.
 63. Taylor SG, Murthy AK, Caldareli DD, Showell JL, Kiel K, Griem KL et al : Combined simultaneous cisplatin/fluorouracil chemotherapy and split course radiation in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 1989, 7(7):846-856.
 64. 이창해, 이봉기, 이원영, 김주덕 : 시험관 및 생체 내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포 특성. *연세의대논문집* 1983, 16(1) :180-192.
 65. 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* 1995, 31:847-856.
 66. Barton M, Boyages J, Crennan E, Davis S : Radiation therapy for early stage Hodgkin's disease : Australian patients of care. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995, 31:227-236.
 67. Britien 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* 1996, 34:367-374.
 68. Ervin TJ, Clark JR, Weichselbaum RR, Fallon BG, Miller D, Fabian RL et al : An analysis of induction and adjuvant chemotherapy in the multidisciplinary treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 1987, 5(1):10-20.
 69. Hong WK, Shasphay SM : Treatment of previously untreated stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Clin N Am* 1980, 13:521-528.
 70. Monks A, Scudiero D, Skehen P, Robert S, Paull K, Vistica D et al : Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991, 83:757-766.

Adress : Prof. Kwang-Joon KOH, Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Chonbuk National University, 634-18, Keum-Am Dong, Duk-Jin Gu, Chon-Ju, South Korea
 Tel : (0652) 250-2023 Fax : (0652) 250-2081
 E-mail : dentrad@moak.chonbuk.ac.kr