

Ginkgo Biloba Extract가 C3H 마우스 섬유육종의 분할 방사선치료에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 서울대학교 의학연구원 방사선의학연구소†, 울산대학교 의과대학 방사선종양학교실†

김종훈*† · 하성환*† · 박찬일*†

목적 : Ginkgo biloba extract (GBE)는 혈액순환개선효과가 있어 기존의 방사선민감제와 달리 혈류저항이 높은 악성 종양에서 저산소세포 분획을 줄일 수 있으나 아직까지는 실제 임상에서 사용되는 저선량 분할 방사선조사시에도 GBE가 방사선조사 효과의 증대를 나타내는지 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구에서는 저선량 분할 방사선조사시 GBE가 방사선조사효과증대를 나타내는지, 또한 정상조직과 악성종양의 혈류량 분포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 통상적인 범위의 저산소세포 분획을 가진 C3H 마우스의 섬유육종(FSall)을 마우스 우측하지에 이식한 후 종양직경이 7 mm에 도달하였을 때 마우스 체중 kg당 100 mg의 GBE를 방사선조사 25시간 전과 매회 1시간 전에 복강내 투여 후 방사선을 조사하였다. 3 Gy 내지 12 Gy의 방사선을 일회 조사시 GBE투여군과 방사선단독조사군의 종양성장지연기간을 비교하여 GBE에 의한 방사선효과 증강율을 구하였다. 3 Gy씩 10회의 분할 방사선조사시 방사선 단독조사군의 방사선량-종양성장지연기간(tumor growth delay, TGD)의 관계식을 구하여 두 실험군의 선형회귀직선 기울기의 비율, 즉 GBE에 의한 방사선효과 증강율을 구하였다. 같은 종양을 이용하여 레이저 도플러 혈류측정기로 정상근육과 종양의 혈류량을 측정함으로써 저혈류 분포의 차이가 존재하는지 확인하였고, GBE 투여에 의한 혈류량분포의 변화 여부를 관찰하였다.

결과 : 3 Gy 내지 12 Gy의 방사선을 일회 조사시 GBE투여군의 종양성장지연기간이 방사선단독조사군에 비하여 의미있게 증가되었으며($p < 0.05$), GBE에 의한 방사선효과 증강율은 3일 종양성장지연 기준으로 1.16이었다. 3 Gy씩 10회의 분할 방사선조사시 방사선 단독조사군의 방사선량-종양성장지연기간(tumor growth delay, TGD)의 관계는 $TGD (days) = 0.26 \times D (Gy) + 0.13$, GBE 병용군의 경우 $TGD (days) = 0.30 \times D (Gy) + 0.13$ 이었고 두 실험군의 직선 기울기의 비율, 즉 GBE에 의한 방사선효과 증강율은 1.19 (95% 신뢰구간; 1.13~1.27)로 나타났다. 같은 종양을 이용하여 레이저 도플러 혈류측정기로 혈류량을 측정한 결과, 혈류량의 분포는 모두 Poisson 분포와 비슷한 양상을 보였다. 정상근육의 혈류량은 평균 10.15 mL/100 g/min, 종양의 혈류량은 평균 7.78 mL/100 g/min으로 종양의 평균 혈류량이 근육에 비하여 낮게 나타났고($p = 0.0001$), 2 mL/100 g/min 이하의 저혈류 분포는 정상근육에 비하여 종양에서 높게 나타났다(0.5% 대 5.2%, $p = 0.005$). 정상근육에서는 GBE 투여에 의하여 혈류량 분포에 큰 변화가 없었던 반면, 종양에서는 2 mL/100 g/min 이하의 저혈류량 분포가 감소하였고, 평균 혈류량은 23.5% 증가되었다($p = 0.0004$).

결론 : GBE는 방사선 일회 조사시 뿐만 아니라 분할조사시에도 방사선치료의 효과를 유의하게 증가시켰다. 또한 정상근육에 비하여 종양의 혈류량을 선택적으로 증가시킴이 확인되었다.

핵심용어 : Ginkgo biloba extract (GBE), 분할방사선치료, 종양혈류

서 론

악성종양의 방사선치료시 세포치사효과는 산소의 존재 여

본 연구는 암연구센터연구비(KOSEF-SRC-56-CRC-93-14) 및 선경인더스트리 연구비의 지원에 의한 것임.

이 논문은 2001년 12월 28일 접수하여 2002년 4월 15일 채택되었음.

책임저자: 하성환, 서울대학교병원 치료방사선과
Tel: 02)760-2524, Fax: 02)742-2073
E-mail: swha@snu.ac.kr

부에 의해 큰 차이를 나타내는데 이는 산소가 충분히 공급되는 세포에서는 산소가 DNA의 손상을 고정시키는데 비하여, 저산소세포에서는 손상이 고정되지 못하고 다시 회복되기 때문이다.¹⁾ 이러한 저산소세포가 악성종양내에 존재한다는 사실은 Powers 등²⁾이 마우스의 림프육종에서 구한 세포생존곡선이 이상성(biphasic) 형태로 나타나는 현상에서 시사된 바 있고 Thomlinson 등³⁾은 종양내 저산소세포의 존재에 대한 명백한 증거로서 인간의 폐암 조직표본상 혈관으로부터의 거리가 100~180 μ m 이상 되어 산소가 확산되지 못하는 부

위에서는 괴사(necrosis)가 관찰되고 괴사 주위에는 활성도는 있지만 저산소 상태인 세포가 존재함을 입증한 바 있다. 악성종양내에 이러한 저산소세포가 많을수록, 즉 저산소세포 분획이 높을수록 방사선치료에 대한 낮은 감수성으로 인하여 치료 효과가 저하되고 궁극적으로 암의 완치가 어렵게 된다는 것은 널리 알려진 사실이다.^{4~7)}

현재까지 실험동물들의 악성종양은 저산소세포 분획이 10~15%인 것으로 알려져 있으나,^{8~10)} 인체 악성종양의 경우에는 광범위하게 측정되어 있지는 않지만 실험동물의 경우와 유사하거나 다소 높은 것으로 생각되고 있다.^{8, 11~13)} 이러한 종양내의 저산소세포 문제를 극복하기 위하여 여러 가지 연구가 진행되었으나 아직까지는 만족스러운 결과를 얻지 못하고 있거나^{10, 14)} 연구가 진행중인 상황이다.

생약제제로서 은행잎 추출물인 *Ginkgo biloba extract* (이하 GBE로 약함)는 적혈구의 변형성을 증가시켜 혈액의 점도를 감소시킴으로써 혈류량을 증가시키는 작용이 있어,^{15, 16)} 종양내 혈관의 특성을 고려할 때 저산소세포 분획을 줄여 방사선치료의 효과를 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

조 등¹⁷⁾과 Ha 등¹⁸⁾은 통상적인 저산소세포 분획을 가진 C3H마우스의 섬유육종에서 GBE의 방사선감수성 증대효과를 실험한 결과 GBE 투여에 의해 저산소세포 분획이 감소되고 종양의 방사선감수성이 높아짐을 입증하였고, 오 등¹⁹⁾과 김 등²⁰⁾은 그 기전이 GBE에 의한 적혈구의 변형능력 증가와 혈액의 점도 감소에 의한 것이며 그 결과 대사상태가 호전된다는 것을 실험으로 입증한 바 있다.

이상의 결과들을 종합하면 GBE는 적혈구의 변형성 증가 및 혈액점도의 감소를 통하여 종양의 혈류량을 증가시켰을 가능성이 크며, 그에 따라 대사상태의 호전을 유발하고 종양내 저산소분획을 감소시킴으로써 종양의 방사선감수성을 향상시킨 것으로 판단된다. 따라서 GBE를 방사선치료와 병용한다면 방사선 단독치료와 비교시 치료이득을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 현재까지 발표된 실험결과들은 5내지 100 Gy의 고선량을 일회 조사한 결과들로서 실제 임상에서 사용되는 저선량 분할 방사선치료시 GBE의 효과가 어떻게 나타날 지에 대한 연구는 아직 발표된 것이 없고, 이러한 결과들은 GBE에 의해 종양의 혈류량이 증가되었음을 암시하고 있지만 구체적으로 어느 정도 혈류량이 증가했고 정상조직의 혈류량에는 어떠한 변화를 일으키는지에 대하여는 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 저자는 첫째, 실제 실험 진행상 효과측정이 가능할 것으로 생각되는 최저 선량인 3 Gy의 방사선을 분할 조사할 경우 GBE가 분할방사선조사의 효과에 어떠한 영향을 주는지 관찰하고, 둘째, 레이저 도플

러 혈류측정기를 이용하여 마우스종양 및 정상조직(하지근육)에서 GBE에 의한 혈류량의 변화정도 양상을 밝히기 위하여 본 실험을 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 실험종양

실험 동물은 미국 보스톤 소재 Massachusetts General Hospital의 치료방사선과내 Edwin L. Steel Laboratory에서 분양받아 서울대학교 의과대학 암연구소내 방사선 생물학 연구실의 항온, 항습 및 무균 설비가 갖추어진 무균동물실에서 defined flora colony 상태로 번식 사육되고 있는 C3H 마우스를 사용하였다. 이들 마우스는 혐기성 flora인 4종의 Clostridium (C.356, C.inoculum, C.bareki 및 C.clostridiformis) 만을 가지고 있으며, 정기적인 검사에서 드물게 Staphylococcus epidermidis가 발견될 뿐 그 이외의 세균이나 마우스의 바이러스, 마이코플라즈마 및 기생충은 가지고 있지 않다.^{21, 22)} 실험 동물은 생후 10 내지 14주, 체중은 20내지 25 gm의 마우스를 사용하였으며, 동물 수는 실험군별로 암수 동일 비율이 되도록 하였다.

실험종양은 C3H 마우스에서 발암인자를 투여하지 않고 자연발생하여 동종이식을 통해 유지되고 있는 섬유육종(Fibrosarcoma, FSaII)을 사용하였다. 이 종양은 미분화된 육종이나 면역원으로써의 효과가 거의 없어 방사선 또는 화학요법제 등의 치료효과 판정에 매우 유용하다. 종양이식은 섬유육종을 가진 마우스로부터 무균상태에서 외과적으로 종괴를 얻은 다음, 작은 가위로 잘게 썰어 미세절편을 만든 후 Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco, USA)과 0.25% trypsin (Gibco, USA)을 4:1로 섞은 용액을 가하여 15분 정도 충분히 pipetting한 다음 mesh로 여과하여 단일종양세포 혼탁액을 얻었다. Trypsin의 작용을 중지시키기 위하여 calf serum (Gibco, USA)을 1:10으로 첨가하여 혼합한 후 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이 단일세포혼탁액의 viability는 trypan blue exclusion법²³⁾으로 측정하였으며, 여러 번의 희석을 통하여 필요한 세포 농도를 얻은 다음, 10³개의 암세포와 조사선량인 120 Gy의 방사선조사를 받은 2×10⁵개의 feeder cell을 혼합하여 접종물의 양이 5μL이 되도록 한 후 미세주사기(Hamilton, USA)로 마우스의 우측 하지 근육에 이식하였다.

2. *Ginkgo biloba extract* 투여 및 방사선조사

GBE (선경인더스트리)는 24% ginkgo flavone glycosides와

6%의 terpenoids를 함유하고 있다. GBE는 mL당 10 mg이 되도록 증류수에 희석한 후 매회 마우스의 체중 kg당 100 mg을 최초 방사선조사 25시간 전 및 매회 1시간 전에 복강내로 주사하였다. GBE의 효과를 관찰하는 실험들은 종양의 직경이 7 mm에 도달하였을 때 시작하며, GBE 2회 투여시는 7 mm에 도달하기 전날에 GBE를 투여하였다.

방사선조사는 서울대학교 의과대학 암연구소에 설치된 실험동물용 방사선조사기인 Cs-137 irradiator (Mark type I, Shepherd, USA)를 사용하였고 3×3 cm² 크기의 조사야로 종양부위에 국소적으로 조사하였다. 마우스는 마취하지 않은 상태에서 고정 가능한 알루미늄 판에 고정하여 무균상태를 유지하도록 특수 제작된 밀폐된 알루미늄 상자에 넣어 방사선을 조사하였다. 방사선조사 중 무균상태의 공기 호흡을 위하여 공기 압축기에 공기여과기와 온도조절장치를 달아 알루미늄 상자 내로 37℃ 무균상태의 공기를 주입하였다.

3. 종양 체적의 측정 및 혈류량 측정

방사선조사 후 실험 다음날부터 매일 같은 시간에 Vernier caliper를 이용하여 종양의 크기를 3~4주 동안 측정하였다. 종양의 3방향의 직경(R₁, R₂, R₃)을 측정하여 다음 수식에 따라 체적(V)을 계산하였다.

$$V=4/3 \times \pi \times R_1/2 \times R_2/2 \times R_3/2$$

종양체적의 측정은 1,000 mm³를 넘을 때까지 매일 측정하여 반대수(semilogarithmic) graph 용지에 표시한 후 이를 연결하여 각 마우스의 종양성장 곡선을 구하였다.

혈류량 측정은 실온(24℃)에서 마우스 체중 kg당 50 mg의 pentobarbital sodium (Entobar, 한림제약)을 복강내 주사하여 마우스를 마취한 후 사지를 핀으로 고정하였다. 마우스의 밑에 따뜻한 판을 설치하여 체온을 36℃로 유지하였으며 직장 내에 온도계를 삽입하여 체온유지 여부를 확인하였다. 종양 및 정상근육의 피부를 박리하여 근막을 노출시킨 후 측정하고자 하는 위치에 직경 0.8 mm의 probe(P-433-3)를 삽입하였다. Probe의 삽입은 특별히 제작한 아크릴 기구를 사용하여 probe가 수직으로 삽입되도록 하였으며 이 때 삽입시의 압력에 의한 혈류장애를 피하기 위하여 probe가 원하는 위치에 도달 후 약간 후퇴시켜 압력이 가해지는 것을 방지하였다 (Fig. 1). 레이저 도플러 혈류측정기(Laserflo BPM 403A, 파장 780 nm, 측정깊이 1 mm)를 이용하여 종양 및 정상하지근육에서 각각 15 내지 20곳의 혈류량을 측정하였으며 이때 averaging time은 5초로 하였다.

4. 실험군 설정

모든 마우스의 오른쪽 귀에 고유번호가 새겨진 클립(ear tag)을 붙여 표식문으로 구분하고, 각 군별로 암수동수로 하여 해당 실험 동물을 무작위로 추출하여 배정하며, 처치 후에도 실험군과 관계없이 무작위로 cage에 넣어 관찰하였다.

일회 방사선조사에 따른 GBE의 효과를 관찰하는 실험에는 대조군, 3, 6, 9, 12 Gy의 방사선 단독 조사군과 방사선조사 25시간 및 1시간 전에 100 mg/kg의 GBE를 투여한 후 동일한 선량의 방사선을 조사한 군으로 나누어 실험을 시행하였다. 각 선량별 실험군의 마우스 수는 방사선단독조사군은 9마리씩, GBE 병용군의 경우 10마리씩이었다.

분할 방사선조사에 의한 GBE의 효과 변화를 관찰하는 실험에서는 대조군, 2, 4, 6, 8일 및 10일간, 1일 1회 3 Gy씩 매일 방사선을 조사한 방사선단독조사군과 최초 방사선조사 25시간 전 및 매회 1시간 전에 100 mg/kg의 GBE를 투여한 후 방사선 단독 조사군과 동일하게 방사선을 조사한 군으로 나누어 실험을 시행하였다. 각 선량별 실험군의 마우스 수는 대조군, 1일 3 Gy씩 2일, 4일, 6일 간 방사선조사한 실험군은 각각 10마리씩, 1일 3 Gy씩 8일간 방사선조사한 실험군은 12마리, 1일 3 Gy씩 10일간 방사선 조사한 실험군은 14마리로 하였다.

레이저 도플러 혈류측정기를 이용한 혈류량 측정 실험은 종양의 직경이 7 mm에 도달하였을 때 시작하였으며 GBE를 투여하지 않은 대조군, 측정 1시간 전 일회 투여군, 측정 24시간 전 일회 투여군, 측정 25시간 및 1시간 전 2회 투여군으로 나누어 각 마우스의 정상하지근육과 종양에서 각각 혈류량을 측정하였고 각 군의 마우스는 각각 12마리로 하였다.

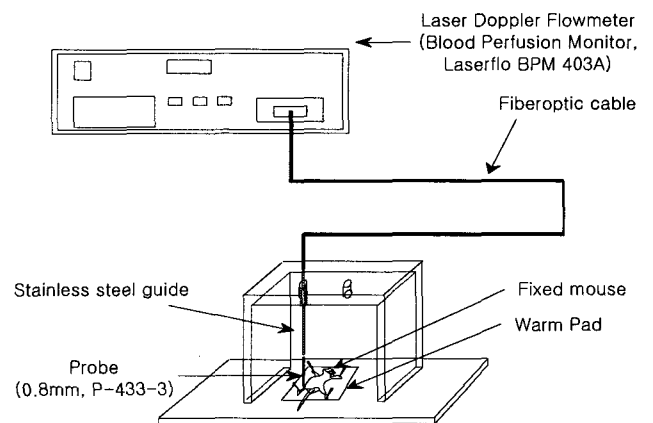


Fig. 1. Measurement of blood flow with laser Doppler flowmetry. Body temperature of mouse was maintained at 36℃ by warm pad and monitored by rectal probe.

5. 결과 분석

일회 방사선조사실험에서는 종양성장기간(tumor growth time, TGT)을 각 마우스의 종양 직경이 7 mm에 도달하여 실험을 시행한 날로부터 종양체적이 500 mm³에 도달하는데 걸리는 시간으로 하였고 10회 방사선조사실험에서는 분할조사 실험 진행 중 종양의 성장 때문에 종양체적이 800 mm³에 소요되는 시간으로 하였다. 종양성장지연기간(tumor growth delay, TGD)은 각 마우스의 측정된 종양성장기간과 대조군의 종양성장기간 평균치의 차이로 정의하며 각 선량별 실험군의 종양성장지연기간은 해당 실험군 마우스의 종양성장지연기간의 평균으로 하였다. 각 선량별 실험군의 평균과 표준오차를 산출하고 각 선량별로 방사선 단독조사군과 비교한 종양성장지연기간의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student t-test와 Wilcoxon rank sum test로 검증하였다. 또한 GBE의 효과를 보기 위하여 각 선량별 실험군의 종양성장지연기간을 산출하고 방사선 단독조사군과 GBE 병용군에서 각각 회귀분석을 통하여 방사선량-종양성장지연기간의 선량반응관계를 구하였다. Multiple partial F test로 두 직선이 통계적으로 의미있게 차이가 있는지 확인한 후 회귀직선으로부터 3일의 종양성장지연기간에 해당하는 방사선량을 산출하였다. 방사선효과증강율은 (방사선 단독 조사시 3일 성장지연에 필요한 방사선량)/(GBE 병용시 3일 성장지연에 필요한 방사선량)으로 정의하였다.

분할 방사선조사시 GBE의 효과를 관찰하기 위하여는 각 선량별 실험군의 종양성장지연기간을 산출하고 분할횟수가 증가함에 따라 GBE에 의한 방사선효과증강이 변화하는 양상을 관찰한 후 slope ratio assay를 통하여 방사선단독조사군과 GBE병용군의 기울기를 비교하고 GBE에 의한 방사선효과증강 및 95% 신뢰구간을 구하였다.

GBE가 혈류량에 미치는 영향을 보기 위하여 각 실험소군에서 측정된 정상 하지 근육 및 종양의 혈류량으로부터 평균 및 표준오차를 산출하고 정상근육과 종양에서의 혈류량 분포 양상을 관찰하였다. 또한 GBE에 의한 혈류량 변화 양상을 관찰한 후 각 실험군의 2 mL/100 g/min 이하의 저혈류량 분포는 Fisher의 직접 확률계산법으로 비교하였고, 각 실험군간의 평균치는 Wilcoxon rank sum test로 대조군과 비교 검토하여 GBE에 의해 혈류량이 통계적으로 의미있게 변화하였는지 확인하였다.

결 과

1. 일회 및 분할 방사선조사시 GBE의 영향

종양세포 이식 후 종양의 성장속도는 비교적 균일하여 90%에서 종양의 크기가 이식 후 10일에 직경 7 mm에 도달하였다. 방사선조사 후 종양체적의 증가속도가 감소하였으며 방사선조사 완료 후 다시 증가하여 이후의 종양 성장속도는 대조군과 동일하였다(Fig. 2).

방사선량을 3 Gy에서 12 Gy까지 3 Gy씩 증가시켜 시행한 일회방사선조사 실험에서는 종양성장지연기간이 방사선단독조사군에서는 3 Gy시 0.36±0.20일, 6 Gy시 1.24±0.26일, 9 Gy시 2.47±0.28일, 12 Gy시 4.27±0.43일이었고 GBE를 병용한 군에서는 3 Gy시 0.71±0.19일, 6 Gy시 1.90±0.26일, 9 Gy시 3.25±0.43일, 12 Gy시 4.67±0.33일이었다. 회귀분석을 시행하여 얻은 방사선량-종양성장지연기간의 관계는 방사선 단독조사군의 경우 TGD (days)=0.43×D (Gy)-1.16, GBE 병용군의 경우 TGD (days)=0.44×D (Gy)-0.67로 나타났다(Fig. 3). 두 직선을 multiple partial F-test로 비교한 결과 이 직선들은 통계적으로 유의하게 차이가 있었고(p<0.05) 종양성장지연기간이 3일에 해당하는 방사선량은 방사선단독치료시 9.67 Gy, GBE 병용시 8.34 Gy로서 방사선효과증강율은 1.16인 것으로 나타났다.

10회의 분할 방사선조사 실험에서는 종양성장지연기간이 방사선단독조사군의 경우 6 Gy시 1.79±0.37일, 12 Gy시 3.09±0.54일, 18 Gy시 4.89±0.27일, 24 Gy시 6.34±0.44일, 30 Gy시 7.73±0.52일이었고 GBE를 병용시 6 Gy시 1.93±0.47일, 12 Gy시 3.74±0.57일, 18 Gy시 5.47±0.82일, 24 Gy

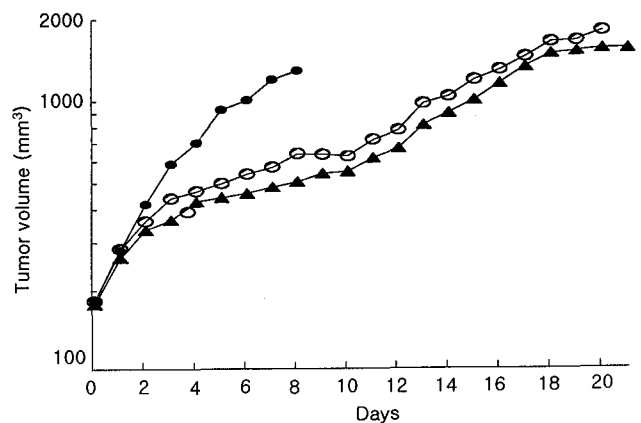


Fig. 2. Tumor growth curves according to treatment. ● Control, ○ Radiation alone (3 Gy×10 fractions), ▲ Radiation with GBE (100 mg/kg×2).

시 8.01 ± 0.64 일, 30 Gy시 8.87 ± 0.47 일이었다. 방사선량-종양 성장지연기간의 관계는 방사선단독조사군의 경우 TGD

(days) = $0.26 \times D$ (Gy) + 0.13, GBE 병용군의 경우 TGD (days) = $0.30 \times D$ (Gy) + 0.13으로 나타났고, slope ratio assay를 시행하여 얻은 방사선효과증강율은 1.19이었으며 95% 신뢰구간은 1.13~1.27로서 GBE 병용군의 경우 방사선효과가 유의하게 증가됨을 나타내었다(Fig. 4).

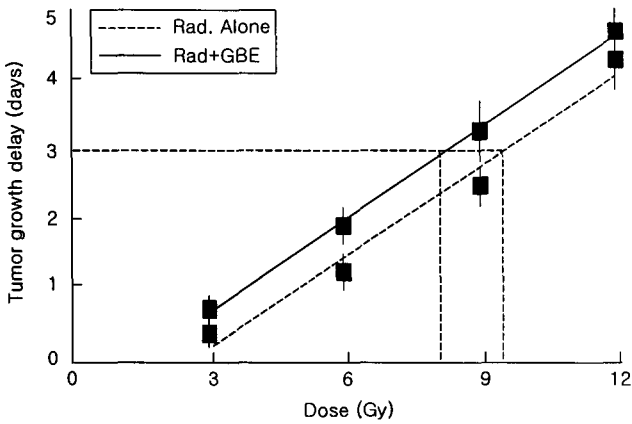


Fig. 3. Effect of GBE on tumor growth delay by single fraction irradiation. Two lines were not overlapped ($p < 0.05$). Radiation doses for 3 day tumor growth delay were 9.67 Gy for radiation alone and 8.34 Gy for radiation with two doses of GBE (100 mg/kg \times 2). The enhancement ratio of GBE was 1.16. Vertical bars indicate standard error.

2. GBE에 의한 혈류량의 영향

GBE를 투여하지 않고 혈류량을 측정한 결과 정상조직과 악성종양의 혈류량 분포는 모두 Poisson 분포와 비슷한 분포를 나타내었다. 정상근육의 혈류량은 평균 10.15 mL/100 g/min인데 비하여 종양의 혈류량 평균은 7.78 mL/100 g/min으로 낮게 나타났고($p = 0.0001$), 혈류량을 2 mL/100 g/min 구간으로 구분하였을 경우 혈류량의 최빈치는 정상근육의 8~10 mL/100 g/min에 비하여 종양은 4~6 mL/100g/min으로 낮았다. 2 mL/100 g/min 이하의 저혈류분포는 정상근육에 비하여 종양에서 높게 나타났다(0.5%와 5.2%, $p = 0.005$) (Table 1, Fig. 5).

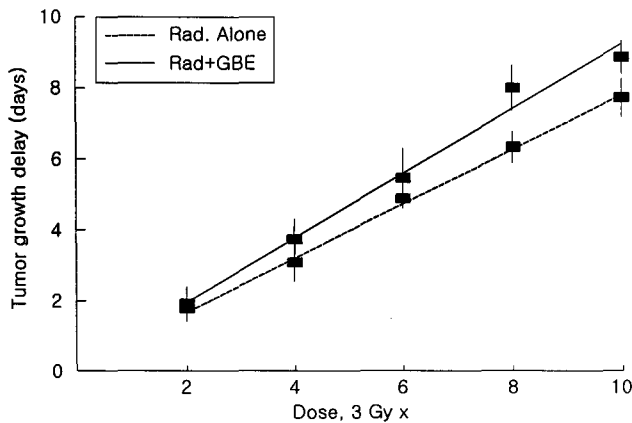


Fig. 4. Effect of GBE on radiation tumor growth delay (multiple fraction irradiation). Two lines have different slopes and the enhancement ratio of GBE was 1.19 (95% C.I. 1.13~1.27). Vertical bars indicate standard error.

GBE에 의한 혈류량분포 변화는 정상 근육의 경우 GBE 투여와 관계없이 대체적으로 비슷한 양상을 나타내었고 각 실험군의 혈류량 평균치 및 표준오차는 대조군, 1시간전 투여군, 24시간 전 투여군, 25시간과 1시간 2회 투여군에서 각각 10.15 ± 0.35 mL/100 g/min, 9.56 ± 0.42 mL/100 g/min, 10.53 ± 0.41 mL/100 g/min, 10.92 ± 0.37 mL/100 g/min이었고 각 실험군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 6). 그러나 종양에서의 혈류량 분포는 평균 혈류량이 대조군 7.78 ± 0.30 mL/100 g/min, GBE 2회 투여군 9.61 ± 0.39 mL/100 g/min로서 GBE 2회 투여에 의해 혈류량이 대조군의 23.5%로 늘어났고, 이는 통계적으로 의미있게 증가한 것으로 관찰되었다($p = 0.0004$) (Table 6). 또한 대조군의 경우 혈류량 최빈치가 4~6 mL/100 g/min인데 비하여 GBE 2회 투여군의 경우 혈류량 최빈치가 8~10 mL/100 g/min으로 나타났고, 2 mL/100 g/min 이하의 저혈류량 분포가 대조군의

Table 1. Blood Flow Measurement with Laser Doppler Flowmetry

Group	No. of mice	Thigh muscle			Tumor		
		Points	Mean \pm S.E. (mL/100 g/min)	p^*	Points	Mean \pm S.E. (mL/100 g/min)	p^*
Control	13	199	10.15 ± 0.35		192	7.78 ± 0.30	
GBE 1	11	175	9.56 ± 0.42	0.10	146	8.67 ± 0.37	0.05
GBE 24	12	169	10.53 ± 0.41	0.70	194	9.18 ± 0.34	0.007
GBE 25	12	191	10.92 ± 0.37	0.09	145	9.61 ± 0.39	0.0004
Total	48	734			677		

*compared to control

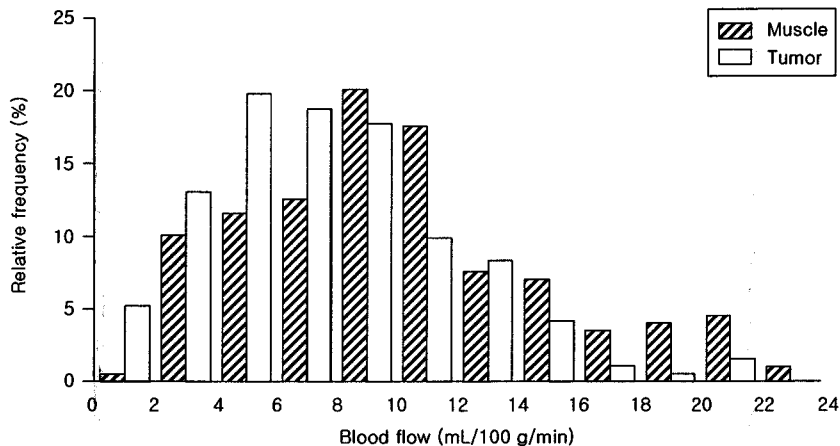


Fig. 5. Frequency distribution of measured blood flow for muscle and tumor without GBE. Low blood flow fraction (less than 2 mL/100 g/min) was higher in tumor than in muscle (0.5% vs. 5.2%, $p=0.005$) and the mean blood flow was higher in muscle (10.15 mL/100g/min in muscle vs. 7.78 mL/100 g/min in tumor, $p=0.0001$).

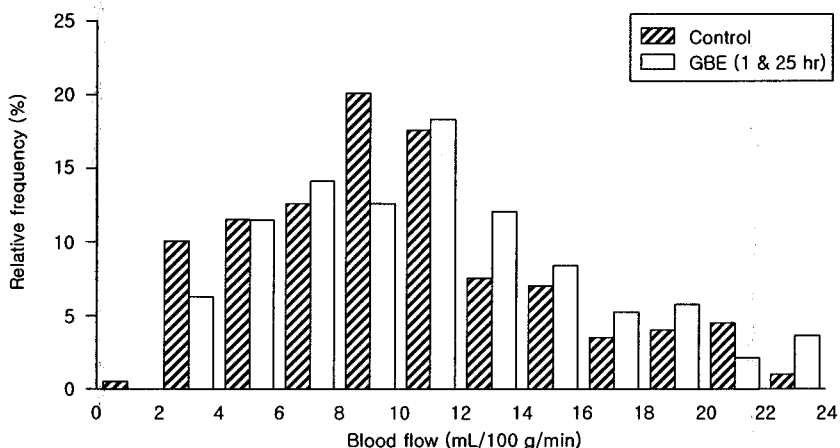


Fig. 6. Frequency distribution of measured blood flow in muscle for control and GBE Group. GBE was injected 1 hour and 25 hours before measurement. Blood flow distribution was not changed with GBE.

경우 5.2%이던 것이 GBE 2회 투여군에서는 각기 0.7%로 감소되어 저혈류량 분포가 GBE에 의하여 감소되었음을 보여 주었다($p=0.02$)(Fig. 7).

고안 및 결론

Ginkgo biloba extract는 은행잎에서 추출된 여러 가지 성분의 복합물질로서 그중 임상에서 유용한 물질로는 flavonoids와 terpenoides로 알려져 있고 사람에게서 경구 투여시 주로 소장에서 흡수되고 투여 후 2 내지 3시간 내에 최대 혈장 농도에 도달하여 24시간이 지나면 투여전 기준치로 떨어진다.¹⁶⁾ 마우스에서는 복강내 주사시 주사 후 45분에서 90분

사이에 최고 혈중 농도에 도달하는 것으로 알려져 있어 본 실험에서는 방사선 조사 1시간 전과 25시간 전, 2회에 걸쳐 투여하였다. GBE의 약리작용으로는 크게 혈류증가, 혈소판 활성화인자의 길항작용, 뇌신경세포의 대사항진 및 뇌신경전달 물질의 장애개선, 자유라디칼 제거로 인한 세포막의 손상억제 등으로 알려져 있다.^{15, 16)} 이중 혈류증가의 기전으로는 첫째, 혈관조절작용으로써 경련이 있는 혈관을 이완시키고 비정상적으로 이완된 혈관의 긴장도를 조절하여 혈류를 증가시키는 작용을 한다. 둘째, 적혈구의 응집을 억제하고 변형성을 증진시켜 혈액의 점도를 저하시키는 작용으로서 *Ginkgo biloba* 200 mg을 4일간 연속 주입시 피부 혈류가 증가하고 혈액의 점도와 탄성이 감소하며 손톱 모세혈관의 혈류증가

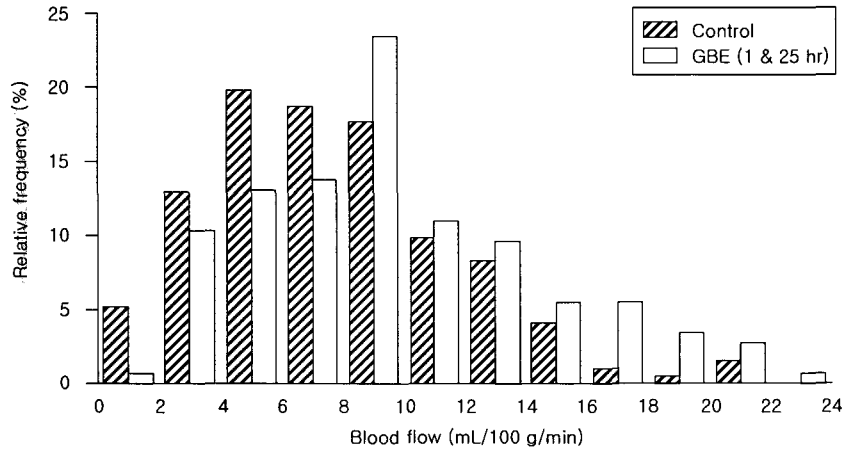


Fig. 7. Frequency distribution of measured blood flow in tumor for control and GBE Group. GBE was injected 1 hour and 25 hours before measurement. Low blood flow fraction (less than 2 mL/100 g/min) was decreased with GBE (5.2% vs. 0.7%, $p=0.02$) and the mean blood flow was increased by 23.5% ($p=0.0004$).

및 적혈구의 응집이 감소되는 것이 보고된 바 있다.¹⁶⁾

본 실험에서 사용한 것과 동일한 실험동물과 종양을 이용하여 조와 하 등은 GBE를 방사선조사 1시간 전 1회 또는 25시간전과 1시간 전, 2회 복강내 투여 후 3 Gy에서 15 Gy까지의 방사선을 조사하였다. 그 결과 얻은 종양성장지연기간을 선형 회귀분석한 결과 양군의 방사선량-종양성장지연기간의 상관관계는 모두 비슷한 기울기의 직선인 것으로 나타났으며, 방사선량에 상관없이 1.32~1.44일의 종양성장지연효과가 있는 것으로 관찰되었다. 또한 GBE는 단독으로 사용될 때에는 종양세포에 영향을 미치지 않으나 방사선과 병용시에는 종양세포의 방사선감수성을 증가시키키 확인되었다.^{17, 18)}

또 다른 조와 Ha 등의 연구에서는 GBE에 의한 방사선감수성 증가를 종양치유방사선량(TCD₅₀)으로 분석하여 대조군에서는 TCD₅₀이 69.6 Gy, GBE 1회 투여시는 67.5 Gy, 2회 투여시는 62.2 Gy임을 관찰하였으며 이러한 결과로부터 종양내의 저산소세포 분획을 산출할 수 있었다.²⁴⁾ 즉 대조군에서는 10.6%인 저산소세포 분획이 GBE 2회 투여시 2.7%로 현저히 감소함을 밝혀 GBE가 종양의 저산소세포 분획을 낮추었음을 보고하였고 ³¹P 핵자기공명 분광분석 결과 종양의 대사상태가 현저하게 호전됨을 밝혀 GBE에 의한 저산소세포 분획 감소와 대사상태의 호전이 종양세포의 방사선감수성 증가로 이어졌음을 밝힌 바 있다.

본 실험 중 일회 방사선실험에서도 대조군과 GBE 병용군의 두 회귀직선의 기울기는 거의 평행인 것으로 나타나 조 등의 실험과 같은 양상을 나타내었으며 두 직선은 통계적으로 유의한 차이를 보인 것으로 확인되었다. 이는 조 등이 밝힌 바와 같이 FSaII 종양의 저산소 분획이 10.6%였던 것이

GBE에 의해 2.7%로 낮아지면서 세포생존곡선상 저산소세포 분획이 상대적으로 큰 비중을 차지하는 직선부분이 아래로 이동됨과 동시에 이러한 직선 영역에서는 방사선량에 관계 없이 GBE가 세포 생존 분획을 방사선 단독 조사에 비해 일정 비율로 낮추었음을 뜻하고, 이러한 세포생존 분획의 일정 비율 감소가 종양성장지연기간이 GBE에 의해 일정량 연장되는 결과를 가져온 것이다.^{17, 18)}

그러나 분할 방사선조사시의 GBE 효과는 일회 방사선조사의 실험결과와 다른 형태로 나타났다. 이는 방사선이 24시간 간격으로 조사되므로, 분할된 방사선조사 사이에는 회복(repair), 재증식(repopulation) 등이 일어나게 되고, 따라서 방사선 단독 조사군의 방사선량-종양성장지연기간의 상관관계를 나타내는 직선의 기울기는 일회 방사선조사 실험군들에 비해 감소한 것으로 나타나게 된다. 반면 GBE 병용군의 기울기는 일회 방사선조사 실험에서와는 달리 방사선 단독조사군과 평행이 아닌 증가로 관찰되어 분할 횟수가 증가할수록 종양성장지연효과도 비례하여 증가하는 양상을 나타내었다. 이는 24시간의 분할 간격동안 충분한 재산소화(reoxygenation)가 일어나고 매회 방사선조사시 종양은 최초 조사시와 비슷한 저산소 분획을 가지게 되어 매일 투여되는 GBE가 최초 3 Gy 조사시와 동일한 비율의 저산소 분획 감소효과를 가져온 것으로 해석할 수 있다. 즉 GBE는 3 Gy 단독 방사선 조사군과 GBE 병용군간의 TGD 차이 만큼 매회 방사선조사시 같은 효과를 내게 되고 분할 조사의 횟수가 늘어날수록 TGD 증가도 비례하여 늘어난 것으로 생각할 수 있다. 따라서 방사선 단독 조사군의 방사선량-종양성장지연기간 상관관계를 나타내는 직선을 기준으로 3 Gy시의 TGD 증가량이 분

할 횟수만큼 비례하여 늘어나고 결국 GBE를 병용한 분할조사군의 방사선량-종양성장지연기간 상관관계 직선은 방사선 단독 조사군에 비하여 분할 횟수가 증가할수록 두 직선간의 간격이 점차 벌어진 것으로 해석된다. 또한 이 실험에서는 GBE의 방사선효과증강율이 1.19이고 95% 신뢰구간이 1.13~1.27이라는 사실을 통하여 GBE가 저선량 분할방사선조사시에도 의미있게 방사선조사효과를 증대시킴이 입증되었다.

GBE의 작용기전에 대해서 김 등은 GBE 투여 후 본 실험과 동일한 종양을 갖고 있는 C3H 마우스에서 혈액점도의 변화를 측정하여 GBE 투여군의 혈액점도가 대조군에 비하여 의미있게 낮아짐을 관찰하였으며 방사선조사 1시간 전 1회 투여군에 비해 1시간과 25시간 전 2회 투여군이 더욱 혈액점도가 낮은 것을 보고한 바 있다.²⁰⁾ 오 등은 방사선 조사 전 1시간 및 25시간에 GBE를 투여한 군의 적혈구 변형성 지수가 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 높음을 보고하여 김 등이 보고한 혈액점도의 변화가 적혈구 변형성 상승에 의한 것임을 실험적으로 입증하였다.¹⁹⁾ 이러한 GBE의 작용기전이 실제로 종양의 혈류량증가로 이어지는지 확인하기 위하여 레이저 도플러 혈류측정기로 혈류량을 측정한 본 실험에서는 GBE가 종양내 혈류량은 증가시킨 반면, 혈류저항이 비교적 적은 정상혈관의 하지근육에서는 혈류량에 큰 변화가 없었던 것으로 나타났다. 이는 GBE가 적혈구의 변형능력을 증진시킴으로써 혈액의 점도를 낮추어 혈관이 불규칙하게 분포되어 있고 혈관 확장제에 대한 반응이 좋지 않은 종양에서만 선택적으로 혈류량 증가 작용을 한다는 사실을 입증한 것이며, 본 실험에서는 23.5%의 혈류량 증가가 있는 것으로 확인되었다. 특히 GBE를 2회 투여시 종양의 혈류량분포가 정상 근육에 보다 근접한 혈류량 분포를 나타내며, 2 mL/100 g/min 이하의 저혈류량 분포가 5.2%에서 0.7%로 감소함으로써 GBE가 저혈류에 의한 저산소세포 분획을 감소시켰음이 밝혀졌다.

그러나 이러한 방사선감수성 증대작용은 종양세포에만 존재하며 정상세포에는 아무런 영향을 미치지 않는다. Ha 등은 GBE 투여 후 방사선조사시 마우스 정상조직 급성반응의 증가 여부를 실험한 결과 방사선에 의한 급성 피부반응과 마우스 공장소낭선의 방사선조사 후 재생 소낭선수가 GBE 투여에 의해 전혀 영향을 받지 않음을 보고한 바 있다.¹⁸⁾

GBE의 안전성에 대한 임상연구 중 German Health Authorities의 결과를 보면 9772예의 임상관찰을 통하여 소화기계 부작용 21예(0.2%), 두통 7예(0.07%), 혈관계 5예(0.05%) 등 부작용의 발생빈도가 매우 낮은 것으로 보고되었고 placebo와 비교한 이중맹검연구에서는 GBE군 932명 중 16예, pla-

cebo군 919명 중 14예에서 부작용이 관찰되어 GBE가 안전한 약제임이 밝혀진 바 있다¹⁵⁾. 동물실험에서 확인된 LD₅₀는 경구 투여시 rat의 경우 측정 가능한 범위에 포함되지 않는 정도였고 마우스의 경우 7.73 g/kg이었으며 정맥주사시 rat와 마우스 모두 1.1 g/kg, 복강내 주사시 rat 2.1 g/kg, 마우스 1.9 g/kg였다¹⁵⁾. 약제 투여 후 26 내지 27주에 확인한 만성독성 검사상 장기에 대한 손상은 전혀 없었으며 기형발생도 전혀 없는 것으로 나타나 DeFeudis는 이러한 결과들을 종합하여 GBE의 부작용 가능성은 매우 낮은 것으로 결론짓고 안전성 면에서 문제가 없는 약제임을 밝힌 바 있다.

이러한 연구결과들을 종합해 볼 때 GBE는 적혈구의 변형성을 증가시켜 혈액점도를 저하시킴으로써 종양의 혈류량을 증진시키고 저산소분획을 감소시켜 방사선감수성을 증가시켰으며 이러한 작용은 고선량 일회 방사선조사 뿐 아니라 저선량 분할 방사선조사시에도 같은 효과를 발휘한 것을 본 연구에서는 확인할 수 있었다. 또한 GBE는 실제 임상에서 사용되는 저선량 분할 방사선치료시 기존의 방사선민감제와는 달리 정상세포에 대한 독성이 거의 없는 방사선민감제로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Hall EJ. The oxygen effect and reoxygenation. In Radiobiology for the radiologist. (4th Ed) J. B. Lippincott, Philadelphia, 1994, pp133-152
- Powers WE, Tolmach LJ. A multicomponent X-ray survival curve for mouse lymphosarcoma cells irradiated in vivo. Nature 1963;197:710-711
- Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br J Cancer 1955;9:539-547
- Dische S. Chemical sensitizers for hypoxic cells: a decade of experience in clinical radiotherapy. Radiother Oncol 1985;3:97-115
- Bush RS. The significance of anemia in clinical radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1986;12:2047-2050
- Gatenby RA, Kessler B, Rosenblum JS, et al. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastasis and its relationship to outcome of radiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988;14:831-838
- Overgaard J. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989;16:535-549
- Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1984;10:695-712.
- Moulder JE, Dutreix J, Rockwell S, et al. Applicability of

- animal tumor data to cancer therapy in human. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;14:913-921
10. **Guichard M.** Chemical manipulations of tissue oxygenation for therapeutic benefit: Keynote address. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:1125-1130
 11. **Denekamp J, Fowler JF, Dische S.** The proportion of hypoxic cells in a human tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1977;2:1227-1228
 12. **Rockwell S, Moulder JE.** Hypoxic fractions of human tumors xenografted into mice : a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:197-202
 13. **Brizel DM, Fosner GL, Prosnitz LR, et al.** Patterns and variability of tumor oxygenation in human soft tissue sarcomas, cervical carcinomas, and lymph node metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1121-1125
 14. **Henk JM.** Late results of a trial of hyperbaric oxygen and radiotherapy in head and neck cancer: a rationale for hypoxic cell sensitizers? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:1339-1341
 15. **DeFeudis FV.** Safety of EGb 761-Containing Products. In: *Ginkgo biloba Extract (EGb 761): Pharmacological Activities and Clinical Applications.* Elsevier, Paris, 1991:143-146
 16. **Kleijnen J, Knipscheld P.** *Ginkgo biloba.* *Lancet* 1992;340(7):1136-1139
 17. **Cho MJ, Yi CJ, Ha SW, Park CI.** The Effect of Ginkgo biloba extract on Radiation Tumor Growth Delay in C3H Mouse Fibrosarcoma. *Journal of Korean Cancer Association* 1995;27:482-489
 18. **Ha SW, Yi CJ, Cho CK, et al.** Enhancement of radiation effect by Ginkgo biloba extract in C3H mouse fibrosarcoma. *Radiother Oncol* 1996;41:163-167
 19. **Oh DH.** Effect of Ginkgo biloba extract on the deformability of mouse red blood cells. Master's thesis, Seoul National University. 1996
 20. **Kim YH.** Effect of Ginkgo biloba extract on the viscosity of mouse red blood cells. Master's thesis, Seoul National University. 1996
 21. **Suit HD, Sedlacek RS, Silver G, et al.** Pentobarbital anesthesia and the response of tumor and normal tissue in the C3H/Sed mouse to radiation. *Radiat Res* 1985;104:47-65
 22. **Chung WK, Chung HD, Ha SW, Park CI.** Influence of Tumor Size on Chemosensitivity of FSa 2 in Combination of Cyclophosphamide and Radiation. *Journal of Korean Cancer Association* 1992;24:109-124
 23. **Freshney RI.** Measurement of cytotoxicity and viability. In: *Culture of animal cells, 3rd ed.,* A John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994, 287-307.
 24. **Cho CK, Yi CJ, Ha SW, Park CI.** The effect of Ginkgo biloba extract on hypoxic fraction of C3H mouse fibrosarcoma. *J Korean Soc Ther Radiol* 1995;13:205-214.

Abstract

The Effect of *Ginkgo Biloba* Extract on the Fractionated Radiation Therapy in C3H Mouse Fibrosarcoma

Jong Hoon Kim, M.D., Ph.D.*†, Sung Whan Ha, M.D., Ph.D.*† and Charn Il Park, M.D., Ph.D.*†

*Department of Therapeutic Radiology, Seoul National University, College of Medicine,

†Institute of Radiation Medicine, Medical Research Center, Seoul National University,

‡Department of Radiation Oncology, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : A *ginkgo biloba* extract (GBE) has been known as a hypoxic cell radiosensitizer. Its mechanisms of action are increase of the red blood cell deformability, decrease the blood viscosity, and decrease the hypoxic cell fraction in the tumor. The aims of this study were to estimate the effect of GBE on fractionated radiotherapy and to clarify the mechanism of action of the GBE by estimating the blood flow in tumor and normal muscle.

Materials and Methods : Fibrosarcoma (FSa11) growing in a C3H mouse leg muscle was used as the tumor model. When the tumor size reached 7 mm in diameter, the GBE was given intraperitoneally at 1 and 25 hours prior to irradiation. The tumor growth delay was measured according to the various doses of radiation (3, 6, 9, 12 Gy and 15 Gy) and to the fractionation (single and fractionated irradiation) with and without the GBE injection. The radiation dose to the tumor the response relationships and the enhancement ratio of the GBE were measured. In addition, the blood flow of a normal muscle and a tumor was compared by laser Doppler flowmetry according to the GBE treatment.

Results : When the GBE was used with single fraction irradiation with doses ranging from 3 to 12 Gy, GBE increased the tumor growth delay significantly ($p < 0.05$) and the enhancement ratio of the GBE was 1.16. In fractionated irradiation with 3 Gy per day, the relationships between the radiation dose (D) and the tumor growth delay (TGD) were $TGD \text{ (days)} = 0.26 \times D \text{ (Gy)} + 0.13$ in the radiation alone group, and the $TGD \text{ (days)} = 0.30 \times D \text{ (Gy)} + 0.13$ in the radiation with GBE group. As a result, the enhancement ratio was 1.19 (95% confidence interval: 1.13~1.27). Laser Doppler flowmetry was used to measure the blood flow. The mean blood flow was higher in the muscle (7.78 mL/100 g/min in tumor and the 10.15 mL/100 g/min in muscle, $p = 0.0001$) and the low blood flow fraction (less than 2 mL/100 g/min) was higher in the tumor (0.5% vs. 5.2%, $p = 0.005$). The blood flow was not changed with the GBE in normal muscle, but was increased by 23.5% ($p = 0.0004$) in the tumor.

Conclusion : Based on these results, it can be concluded that the GBE enhanced the radiation effect significantly when used with fractionated radiotherapy as well as with single fraction irradiation. Furthermore, the GBE increased the blood flow of the tumor selectively.

Key Words : *Ginkgo biloba* extract (GBE), Fractionated irradiation, Tumor blood flow