

## A Synthesis of Iron Oxide Based and Gadolinium Oxide Based Radiosensitizer for the Therapeutic Enhancement of Proton Beam Cancer Therapy

Bo Sun Kang

Department of Radiological Science, Konyang University, Daejeon, Korea 302-832

### 양성자 빔 암치료효과 개선을 위한 산화철 및 산화가돌리늄 나노입자 기반의 방사선증감제 합성

강보선

건양대학교 방사선학과

#### Abstract

Metallic nanoparticles have attractive properties in biomedical applications such as diagnostics and therapeutics. Cross linked dextran coated iron oxide nanoparticles (SPIONs) and silica coated gadolinium oxide nanoparticles (SPGONs) have been synthesized as a radiosensitizer in the proton beam cancer therapy. The dextran and silicased for the protective moieties on the SPIONs and SPGONs respectively. Size distributions of synthesized nanoparticles were confirmed 3~5 nm for SPIONs and 30~100 nm for SPGONs by transmission electron microscope (TEM). Cell survival fraction measurement and Western blot assay were performed to evaluate the radiosensitization effects of synthesized radiosensitizer. The calculated radiosensitization of SPIONs and SPGONs at 90 % cell death from the measured cell survival curves were 1.23 and 1.03 respectively. Western blotting results also show the same consistent results that the amount of released cytochrome c from mitochondria was considerably increased for the cancer cells taken up SPIONs.

Keyword : Metallic nanoparticle, Radiosensitizer, Iron oxide nanoparticle, Gadolinium oxide nanoparticle, Cytochrom C, Western blotting

#### 요 약

금속나노입자는 진단이나 치료를 포함한 의생명응용분야에 있어 매력적인 특징들을 갖고 있다. 양성자 빔 치료를 위한 방사선증감제로 사용하기 위해 가교덱스트란이 코팅된 산화철나노입자(SPIONs)와 실리카가 코팅된 산화가돌리늄나노입자(SPGONs)를 합성하였다. 덱스트란과 실리카는 각각 SPIONs와 SPGONs의 보호수단이다. 합성된 SPIONs와 SPGONs를 투과전자현미경(TEM)으로 분석한 결과 각각 평균 직경이 3~5 nm와 30~100 nm였다. 합성된 방사선증감제의 효과를 평가하기 위해 세포생존곡선 측정과 Western blotting을 수행하였다. 측정된 세포생존곡선으로부터 계산된 90% 세포사멸 시 방사선증감비는 SPIONs와 SPGONs에 대하여 각각 1.23과 1.03이었다. Western blotting 결과 역시 Cytochrome C의 발현량이 SPIONs를 처리한 암세포에서 유의적으로 증가됨을 보였다.

중심단어: 금속나노입자, 방사선증감제, 산화철나노입자, 산화가돌리늄나노입자, Cytochrome C, Western blotting

## I. INTRODUCTION

방사선 치료는 방사선 조사방법에 따라 크게 체외 조사법과 근접조사법으로 나눌 수 있다. 외부조사법은 주로 방사성동위원소인 Co-60에서 방출되는 감마선이나, 선형가속기에서 발생된 고에너지 X선을 이용하여 비침습적인 방법으로 심부암을 치료하는데 활용되고 있으며, 근접조사법은 Ra-226, Ir-192, Au-198, Pd-103, I-125 등 알파선이나 베타선을 방출하는 동위원소를 체강을 통해 종양에 근접시키거나 종양조직 내에 직접 삽입하여 자궁경부암, 전립선암, 구강암 등의 치료에 이용되고 있다. 물론 I-131을 이용한 갑상선암 치료의 방법처럼 방사성동위원소를 특정 종양세포에 선택적으로 포획되는 종양표적분자에 표지하여 암세포를 선택적으로 치료하는 치료용 방사성의약품 이용 방사선치료도 있다. 어떤 방법을 이용하든 방사선을 이용한 암치료 원리는 모두 동일하다. 방사선에너지가 암세포에 전달하여 세포의 손상을 유발하여 암세포를 사멸시키거나 세포대사를 억제시켜 암세포의 증식을 멈추게하는 것이다. 방사선이 암세포에만 조사될 수 있도록 여러 가지 기술들이 이미 개발되었고 여전히 개발 중에 있지만, 체외조사의 경우 심부에 존재하는 암세포에만 방사선을 조사할 수가 없기 때문에 방사선 치료에 있어서 가장 중요한 부분은 “치료가능비(Therapeutic Ratio)”라고 말할 수 있다. 치료가능비란 종양세포의 방사선감수성과 정상세포의 방사선감수성의 비를 말하는 것으로서 종양세포의 방사선감수성이 정상세포의 방사선감수성보다 더 커야만 방사선에 피폭된 정상조직은 살아남고 종양조직은 사멸될 수 있다. 만약, 정상세포의 방사선감수성이 암세포의 방사선감수성보다 높은 경우에 방사선치료를 시행한다면 정상조직은 모두 사멸되고 암세포만 살아남는 아이러니한 결과를 얻게 될 것이다. 방사선감수성은 종양세포의 종류에 따라 다르며, glioblastoma와 같은 특정 암세포는 방사선감수성이 매우 낮다. 방사선감수성이 매우 낮은 특정 암에 대해서는 원론적으로 방사선치료를 처방할 수가 없다. 따라서 방사선감수성이 낮은 암 치료에 방사선을 적용하기 위해서는 암세포의 방사선

감수성을 증가시킬 수 있는 방사선증감제의 사용이 필수적이다. 기존의 방사선증감제는 화학적 방사선증감제로서 저산소상태인 암세포의 산소농도를 증가시켜 방사선조사 시 산소효과(Oxygen Enhancement Ratio)를 증대시키는 것이다. 이러한 화학적 방사선증감제의 경우 암세포의 방사선감수성을 증가시키더라도 산소포화상태에 있는 정상조직의 방사선감수성보다 더 커질 수는 없다. 하지만 BNCT(boron neutron capture therapy)에서의  $^{10}\text{B}$ 의 역할과 같은 물리적 방사선증감제는 암세포의 방사선감수성을 정상세포의 방사선감수성보다 훨씬 더 크게 증가시킬 수 있다.<sup>[1,2,3]</sup>

본 연구에서는 물리적 방사선증감제로서 금속나노입자인 산화철 나노입자와 산화가돌리늄나노입자를 합성하였고, 합성된 방사선증감제의 양성자 빔에 대한 방사선감수성 증가의 효과를 glioblastoma cell line을 이용하여 평가하였다. 방사선감수성 증감효과는 세포사멸의 주요 요인인 미토콘드리아 손상 시 발현되는 Cytochrome C의 발현 양과 양성자 빔 조사선량에 따른 세포생존율을 측정하여 평가하였다. 금속나노입자 기반의 방사선증감제는 의료진단에 사용되는 X선에 대한 감쇄계수가 연조직에 비해 매우 크고 자성강도가 매우 세기 때문에 CT나 MRI에서 조영제의 역할도 할 수 있으므로 진단과 치료가 모두 가능한 theragnostics에 활용될 수도 있다. 본 연구에서 금속나노입자의 재료로 Fe과 Gd를 선택한 이유는 본 논문의 주제인 방사선증감제로서의 기능뿐만 아니라 theragnostics에 활용 가능성까지 고려해서 선정되었다.

## II. MATERIAL AND METHOD

### 1. 금속나노입자 기반 방사선증감제의 합성

본 연구에 사용된 금속나노입자 기반 방사선증감제는 텍스트란이 코팅된 산화철나노입자와 실리카가 코팅된 산화가돌리늄나노입자이다. 금속나노입자는 인체 세포에 직접 노출될 경우 세포 독성이 발현되므로 금속나노입자가 인체세포와 직접 접촉되는 것을 방지하기 위해 산화철에는 가교텍스트란을 코팅하였고, 산

화가돌리늄나노입자에는 실리카를 코팅하였다.<sup>[4]</sup> 사용된 모든 화학약품은 추가적인 정화공정이 필요없는 고순도의 재료를 사용하였으며, 모든 용액의 제조에는 탈이온화공정(deionization process)을 통해 얻어진 2차 증류수를 사용하였다.

### 1.1 산화철나노입자 합성

가교덱스트란(crosslinked dextran)이 코팅된 산화철나노입자는 공침법을 이용하여 합성하였다.<sup>[5]</sup> 우선, 0.1 ~ 3 g의 덱스트란과 염화철 1.2 mmol을 일정량의 증류수에 녹인다. 여기에 2 ml의 암모니아수 첨가하고, 약 10분간 강하게 교반한다. 처음 어두운 노란색을 띠던 용액이 순식간에 갈색으로 변하게 되는데 용액 색의 변화가 산화철나노입자 생성의 지표이다. 이 용액을 70°C로 한 시간 가량 가열하여 반응시킨다. 반응 후 바닥에 검은 침전물이 형성되는데 이것이 덱스트란이 코팅된 산화철나노입자이다. 이 침전물을 회수하여 증류수로 세척하고 이렇게 합성된 덱스트란코팅 산화철나노입자에 epichlorohydrin (ECH)를 첨가하고 2.5 M NaOH용액에 분산시킨 후 상온에서 24시간 방치하면 덱스트란의 가교가 형성되어 가교덱스트란코팅 산화철나노입자를 얻을 수 있다.

### 1.2 산화가돌리늄나노입자 합성

산화가돌리늄나노입자는 요소와 1-프로판올을 이용한 수열합성법을 이용하여 합성하였다. 0.256 g의 염화가돌리늄을 80 ml 증류수에 녹인 후 6 g의 요소와 120 ml의 1-프로판올을 첨가한다. 이 혼합액을 교반하며 85°C에서 1.5시간 가열하면 흰색의 침전물이 생성되는데 이것이 산화가돌리늄나노입자이다. 이렇게 합성된 산화가돌리늄나노입자를 증류수와 EtOH을 이용하여 세척하고 실리카 코팅을 위해 80 ml EtOH에 분산시킨 후 20 ml의 증류수와 1 ml의 NH<sub>4</sub>OH수용액(30 wt%), 24 µl의 tetraethoxysilane을 첨가한 후 교반하며 1시간 동안 상온에서 반응시킨다. 이 후 분산제인 CTAB 0.4g 수용액을 첨가한 후 상온에서 1시간 안정화시키면 실리카가 코팅된 산화가돌리늄나노입자를 얻을 수 있다.

## 2. 방사선증감제의 세포 내 축적도 평가

방사선증감제가 효율적으로 기능을 발휘하기 위해서는 암세포 막을 잘 투과하여 암세포 내 축적도가 높아야 한다. 일반적으로 약물의 세포 내 흡수는 크게 농도차이에 의한 수동적 흡수(passive uptake)와 리간드 매개 세포흡수(ligand mediated endocytosis)에 의한 선택적 흡수(selective uptake)로 나뉘어진다. 본 연구에 사용된 금속나노입자 기반 방사선증감제는 리간드나 항체를 사용하지 않았으므로 오로지 농도차이에 의한 수동적 흡수만 일어난다. 따라서 뇌암세포인 U373MG (human glioblastoma cell line) 1x10<sup>5</sup> 개를 12 well plate에 seeding한 후 배양액에 일정 농도의 합성된 금속나노입자를 희석하여 24시간동안 배양하였다. 배양 후 세포 고정방법은 일반적인 세포실험방법을 따라 수행하였으며, 세포 내 축적도를 확인 및 양성자 빔 조사 전에 세포를 수차례 세척하여 세포 내로 흡수되지 않은 나노입자는 제거한 후 실험하였다.

산화철나노입자의 세포 내 축적도 평가를 위해서는 철이온에 대한 상용의 염색법과 염색시약인 Prussian Blue를 이용해서 세포 내에 축적된 산화철나노입자를 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였으나, 가돌리늄은 세포실험에서 사용되지 않는 시약이고 염색법이나 염색 시약이 존재하지 않기 때문에 유로퓸(europium)을 도핑하여 confocal laser scanning microscopy(CLSM)로 관찰하였다. 유로퓸은 CLSM 영상에서 레이저의 광자극에 의해 붉은 색의 발광을 하므로 세포 내에 축적된 유로퓸이 도핑된 산화가돌리늄은 붉은 색으로 확인이 가능하다.

## 3. 합성된 방사선증감제의 방사선증감효과 평가

기존의 방사선 치료는 서론에서 설명한 바와 같이 주로 감마선이나 X선을 이용하였으나, 최근에는 양성자 빔과 같은 입자방사선이 가진 브래그 피크(Bragg's Peak)라는 흡수선량분포의 특징 때문에 종양부위에 제한된 방사선량 부여가 가능하여 뇌암 등 난치성 암에 대한 입자방사선치료의 적용 예가 증가하고 있다.<sup>[6,7,8]</sup> 최근 몇 년 사이에 국내에서도 국립암센터에서 양성자가속기를 도입하여 양성자빔 치료를 실시하고 있으며, 삼성서울병원에서도 양성자 치료기를 도입하여 곧 치료를 시작할 계획이다. 심지어 국립암센터에서는 중이온입자가속기를 이용한 중이온 치료를 위한 사업을

추진 중에 있다. 금속나노입자기반 방사선증감제는 세포의 방사선흡수선량을 증가시키는 효과 이외에 부가적으로 PIXE(particle induced X-ray emission), Auger electron 등의 저에너지 2차 방사선을 방출하여 더 효율적인 방사선증감효과를 나타낸다.<sup>[9,10,11]</sup> 따라서 본 연구에서는 합성된 방사선증감제의 방사선증감효과를 양성자 빔에 대해 실험하였다. 양성자빔 조사는 국립암센터의 MC50 싸이클로트론을 이용하여 40 MeV 양성자빔에 대해 실시하였다. 양성자빔의 에너지에 따른 브래그피크의 깊이가 세포의 위치가 될 수 있도록 배치하였으며, 세포에 조사 전에 필름선량계를 이용하여 흡수선량을 측정된 후 세포에 조사하였다. 이러한 실험조건은 국립암센터의 싸이클로트론 제어실에 설치된 싸이클로트론 구동 프로그램의 계산결과에 따라 결정하였다. 또한, 세포생존률을 계산함에 있어서 방사선조사 당시의 세포 수 차이에 따른 오차를 제거하고자 양성자 빔을 조사하기 전에 각 세포배양 샘플 내의 세포수를 측정하고 비교군(control group)의 집락 형성률 (plating efficiency)를 기준으로 각 샘플 내 세포 수에 대한 정규화 (normalization)된 측정값으로 세포 생존률을 판단하였다.

방사선에 조사된 세포의 생존률 S과 세포의 방사선 흡수선량 D는 다음과 같은 관계에 있다. 여기서,  $\alpha$ 와  $\beta$ 는 세포의 방사선감수성과 조사한 방사선의 종류에 의존하는 상수이다.

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

그러므로 합성된 방사선증감제가 방사선증감효과를 가지고 있다면 동일한 방사선의 종류에 대해서도  $\alpha$ 와  $\beta$ 값이 변하여 생존곡선의 경사도가 변하게 될 것이다. 그러므로, 합성된 방사선증감제를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포에 대해 방사선흡수선량 변화에 따른 세포생존곡선을 획득 후 90 % 치사율에 대한 각각의 선량비를 방사선증감비(radiation sensitization ratio)로 정의하였다.<sup>[12]</sup>

방사선증감비

$$= \frac{\text{방사선증감제를 투여하지 않은 세포의 치사선량}}{\text{방사선증감제를 투여한 세포의 치사선량}}$$

또한, 방사선에 의한 세포사멸 작용에 의한 치사선량율의 감소인지 확인하기 위하여 양성자 빔에 조사

된 세포의 단백질을 추출하여 방사선 치사의 biomarker인 cytochrom c의 발현량을 Western Blot Assay를 이용하여 분석하였다. 방사선증감비 측정 시에 합성된 방사선증감제 자체의 독성효과가 기여할 수도 있으므로 증감제투여 농도를 MIT assay결과 독성이 나타나지 않는 일정 농도로만 투여하였다. 실험에 사용한 방사선증감제의 농도는 SPIONs의 경우 100  $\mu$ g/ml 였으며, SPGONs의 농도는 50  $\mu$ g/ml 였다.

### III. EXPERIMENTAL RESULT

#### 1. TEM을 이용한 증감제의 형상과 크기분포

Fig. 1의 (a)와 (c)에 합성된 가교덱스트란코팅 산화철나노입자의 투과전자현미경 사진과 나노입자의 크기 분포를 나타내었다. 또한, Fig. 1의 (b)와 (d)에 합성된 실리카코팅 산화가돌리늄의 투과전자현미경 사진과 나노입자의 크기분포를 나타내었다. Fig. 1에 보인 투과전자현미경 분석에 의하면 합성된 금속나노입자는 모두 구형으로서 일정한 형상을 이루고 있다. 크기 분포에 있어서는 평균 직경이 산화철나노입자의 경우 대략 3.5 nm 정도였고, 산화가돌리늄의 경우 대략 70 nm 정도였다.

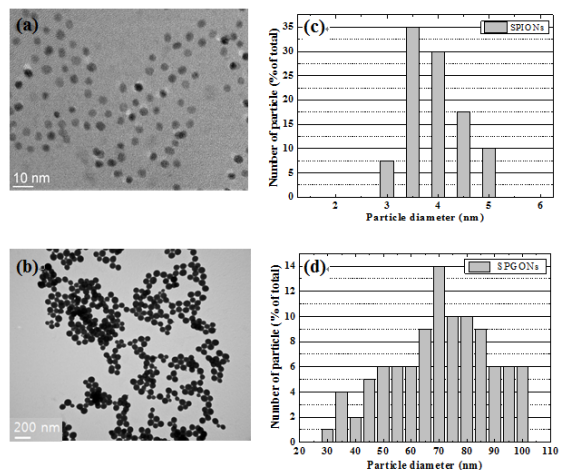


Fig. 1. TEM images of (a) cross linked dextran coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) (b) silica coated superparamagnetic gadolinium oxide nanoparticles (SPGONs), and histograms showing the size distribution of (c) SPIONs (d) SPGONs..

## 2. 방사선 증감제의 암세포 내 축적도 평가

합성된 방사선증감제의 암세포 내 축적도를 평가하기 위하여 Prussian Blue로 세포 내 SPIONs를 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 영상과 CLSM으로 세포 내 SPGONs를 관찰한 영상을 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

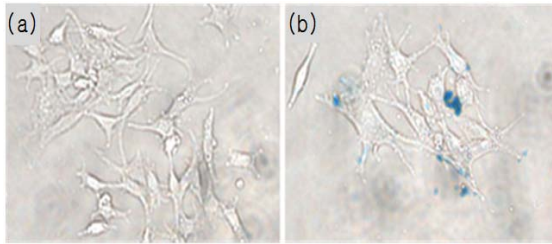


Fig 2. U373MG cells were stained with Prussian blue. (a) U373MG cells only (b) U373MG cells incubated for 4 hours in the SPIONs treated medium.

Fig. 2의 (b)에 보인 바와 같이 세포질 내에 흡수된 SPIONs가 Prussian Blue에 의해 푸른 색으로 염색되어 있음을 알 수 있다. 따라서 합성된 가교텍스트란코팅 SPIONs는 세포 내로 잘 흡수되어 세포질 내에 축적됨을 확인하였다.

실리카코팅 SPGONs의 경우 가돌리늄을 광학현미경으로 관찰할 수 있는 염색시약이 없으므로 SPGONs 합성 시에 유로퓸을 도핑하여 CLSM으로 세포 내 축적도를 평가하였다. 유로퓸은 레이저 광자극에 의해 붉은 색 발광을 하므로 CLSM으로 확인이 가능하다. CLSM영상 Fig. 3의 (b)에서 볼 수 있는 바와 같이 세포질 부분이 붉은 색으로 발광한다는 것은 유로퓸이 세포질 내에 흡수되었다는 증거이고 이는 SPGONs가 세포질 내에 축적되어 있음을 뜻한다.

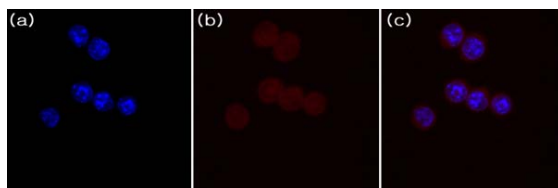


Fig. 3. SPGONs Uptake of U373MG cells imaged by confocal microscopy. (a) Detection of nucleus (DAPI, a fluorescent stain that binds strongly to DNA) (b) Detection of  $\text{Eu}^{3+}$  doped SPGONs within the cytoplasm of U373MG cells (c) merged image of nucleus image and cytoplasm image.

## 3. 세포생존곡선을 이용한 합성된 방사선증감제의 증감효과 평가

양성자 빔을 조사한 암세포의 생존곡선을 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 방사선흡수선량 증가에 따른 세포생존율은 방사선증감제를 흡수하지 않은 비교군에 비해 SPIONs를 흡수한 암세포와 SPGONs를 흡수한 암세포에서 유의하게 감소함을 알 수 있다. 따라서 합성된 금속나노입자들은 방사선증감 효과가 있다고 판단되며, 방사선증감비는 SPIONs가 SPGONs보다 더 크게 나타났다.

비교군과 각각의 방사선증감제를 흡수한 암세포 그룹의 양성자 빔 흡수선량에 대한 세포생존율 측정은 clonogenic assay를 통해 측정하였으며 측정된 결과는 아래 Table 1과 같다.

측정된 세포생존곡선에서 비교군과 각각의 방사선증감제를 흡수한 SPIONs그룹과 SPGONs그룹에서의 90 % 세포사멸에 필요한 양성자빔 흡수선량은 Table 2에 보인바와 같다.

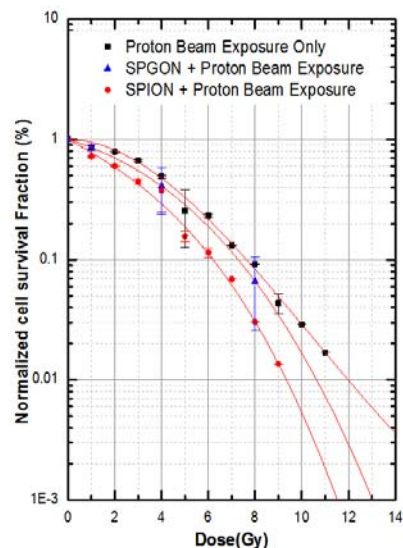


Fig. 4. Survival fraction of U373MG cells and the proton irradiated U373MG cells pretreated with SPIONs and SPGONs.

Table 1. Cell survival fractions at different doses for different radiosensitizer treated groups

Group(abscissa) Dose(ordinate)	control	SPIONs group	SPGONs group
1 Gy	0.86±0.04	0.72±0.01	0.85±0.05
4 Gy	0.49±0.02	0.37±0.02	0.41±0.07
8 Gy	0.09	0.03	0.06
12 Gy	0.002	0	0
16 Gy	0	0	0

Table 2. Proton beam absorption dose of 90 % cell death with radiosensitizers

Group	control	SPIONs group	SPGONs group
Dose (Gy)	7.7	6.2	7.15

Table 2의 90 % 세포사멸에 필요한 양성자 빔 흡수 선량을 이용하여 계산된 방사선증감비는 Table 3에 보인바와 같다.

Table 3. Radiosensitization of synthesized radiosensitizers and dose reduction ratio to control group

Radiosensitizers	Radiosensitization	Dose reduction (%)
SPIONs	1.24	20
SPGONs	1.08	7.2

#### 4. Cytochrome c 발현량 측정을 통한 방사선증감제의 증감효과 평가

암세포에 각각의 방사선증감제를 흡수시킨 후 양성자 빔을 조사한 후 각 그룹 별로 단백질을 추출하여 Western blotting으로 Cytochrome C의 발현량을 분석하였다. Cytochrome C는 미토콘드리아 손상에 의해 세포사멸이 발생할 때 발현되는 단백질로서 방사선에 의한 세포사멸의 biomarker이다.<sup>[13]</sup>

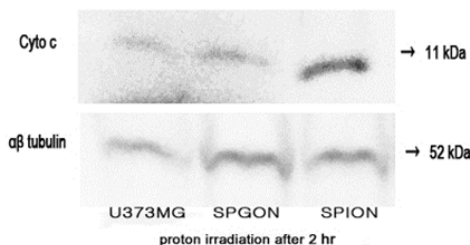


Fig. 5. Western blot analyses of cytochrome c in U373MG cells. Cells were incubated for 2 hrs after proton irradiation.

Fig. 5에서 보이는 바와 같이 띠의 색깔기를 비교할 때, 비교군보다 SPGONs를 흡수한 그룹에서 약간 더 많은 양의 Cytochrome C가 관찰되며, SPIONs를 흡수한 그룹에서는 비교군보다 상당히 많은 양의 Cytochrome C가 관찰되므로 합성된 SPGONs와 SPIONs 모두 방사선증감효과는 있지만 SPIONs의 방사선증감효과가 훨씬 더 크다는 것을 알 수 있다. Cytochrome C의 발현량으로 확인한 SPGONs와 SPIONs의 방사선증감효과에 대한 결과는 세포생존곡선을 통해 얻어진 90 % 세포사멸에 필요한 흡수선량 감소의 결과와 정성적으로 일치한다. 따라서 합성된 SPIONs와 SPGONs는 방사선증감제 기능을 한다는 것이 충분히 검증되었다.

#### IV. DISCUSSION

40 MeV 양성자 빔을 조사해서 측정된 세포생존곡선에서 계산된 방사선증감비와 Western blotting을 이용하여 측정된 Cytochrom C의 발현량 측정에서 구해진 방사선 조사에 의한 세포사멸(apoptosis)량을 비교해보면 SPIONs가 SPGONs보다 방사선증감효과가 더 큰 것으로 나타났다. 하지만, 방사선물리학적 관점에서 보면 SPIONs보다 SPGONs에서의 방사선증감효과가 더 커야한다. 왜냐하면, 엑스선이나 감마선과 마찬가지로 양성자 빔 역시 1차적으로 궤도전자와 반응하고 핵 내 흡수나 핵과의 충돌에 의해 핵반응을 포함한 기타의 반응이 일어나므로 전자밀도, 즉, 원자번호가 큰 가돌리늄에서 철보다 더 많은 양성자와의 상호작용이 일어나기 때문이다. 그럼에도 불구하고 실험결과가 물리학적 이론과 상반되는 이유는 다음과 같다. 첫째, 본 연구에 사용된 금속나노입자 기반의 방사선증감제는 리간드나 항체를 사용하지 않았으므로 오로지 농도차이에 의한 수동적 흡수만 일어날 것이라고 판단된다.<sup>[14]</sup> 그런데 세포를 배양하는 배양액 내에 희석시킨 방사선증감제에 의한 영향을 배제하기 위해 MIT 독성이 나타나지 않는 농도로 처리했으므로 배양액 내의 금속나노입자 농도가 달랐기 때문에 세포 내 금속나노입자의 축적도가 달라서 방사선증감비가 달라졌을 것으로 판단된다. 즉, 산화철의 농도는 100 µg/ml 였고 산화가돌리늄의 농도는 50 µg/ml 였으므로 농도

차이에 의한 세포 내 흡수의 양이 산화철나노입자가 더 많았을 것이다. 또한, 합성된 나노입자의 평균 직경이 산화철나노입자는 약 3.5 nm이고 산화가돌리늄은 약 70 nm이므로 나노입자 하나당 필요한 산화철분자의 개수와 산화가돌리늄의 개수비를 각 분자의 크기가 같다는 가정 하에 구해보면 대략 43 : 343000이 되는데, 산화철의 분자량이 232 amu 이고, 산화가돌리늄의 분자량이 362 amu이므로 100  $\mu$ g 과 50  $\mu$ g 내에 존재하는 산화철 분자와 산화가돌리늄 분자의 비는 0.431 : 0.138 이므로 1 ml 당 산화철나노입자와 산화가돌리늄나노입자의 개수 비는 0.431/43 : 0.138/343000이므로 대략 25,000 : 1의 비로 SPIONs 입자농도가 SPGONs 입자농도보다 훨씬 더 크다는 것을 알 수 있다. 따라서 암세포 내로의 흡수가 SPIONs가 훨씬 더 많이 일어난다. 두 번째 이유로서 방사선증감제의 크기이다. 금속나노입자의 세포 내 흡수는 입자의 크기에 따라 많이 달라질 수 있다.<sup>[4]</sup> TEM으로 측정된 금속나노입자의 평균 지름이 SPIONs는 약 3.5 nm, SPGONs는 약 70nm 이므로, SPIONs에 비해 SPGONs의 크기가 부피단위로 약 8000 배 크기 때문에 세포 내 흡수에 있어서도 유의할 만한 차이가 있었을 것을 판단된다. 마지막으로, 코팅 물질의 차이에 의해서 SPIONs와 SPGONs의 세포 내 흡수가 달랐기 때문이다. SPIONs에 코팅된 텍스트란은 세포 대사에 필요 물질이므로 SPGONs에 코팅된 실리카보다 세포 내 흡수가 더 많이 일어난다.<sup>[14]</sup> 따라서, 향후 SPGONs의 직경을 SPIONs 정도로 조절할 수 있는 합성법을 개발하고 금속나노입자의 표면에 리간드나 항체 등과 같은 암세포 표적분자를 결합시킨다면 현재 개발된 물리적 방사선증감제는 방사선치료효과를 획기적으로 개선할 수 있을 것으로 판단된다.

## V. CONCLUSION

본 연구에서 개발된 물리적 방사선증감제는 양성자빔 조사 후 측정된 세포생존곡선 분석 결과와 마이트콘드리아 손상 시 발현되는 방사선 세포사멸의 바이오마커인 Cytochrome C의 발현량 분석에서 얻어진 결과와 일치하게 암세포에 대해 방사선증감효과가 있음을 보였다. 현재 사용되고 있는 화학적 방사선증감제

는 주로 산소효과를 증가시켜 방사선증감작용을 유발하는데 비해 개발된 물리적 방사선증감제는 암세포의 유효원자번호 자체를 증가시키고 2차 방사선을 발생하여 세포 내에서 방사선과 세포의 직접작용을 증가시킴으로서 방사선증감효과를 유발하는 획기적인 방사선증감제로서의 가능성이 매우 높다고 판단된다. 하지만, 금속나노입자의 인체 내 대사 등에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

## Reference

- [1] Barth RF, Coderre JA, Vicente MG, Blue TE, "Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects", *Clin Cancer Res*, Vol. 11, No. 11, pp. 3987-4002
- [2] Iwagami et al., "Boron Carbide Particle as a Boron Compound for Boron Neutron Capture Therapy", *Nucl Med Radiat Ther* 2014, 5:177 (online journal, <http://omicsonline.org/nuclear-medicine-radiation-therapy.php>)
- [3] Coderre JA, Morris GM, "The radiation biology of boron neutron capture therapy", *Radiat Res*, Vol. 151, No. 1, pp. 1-18
- [4] H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang and Z. Xi, "Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition", *Journal of Applied Toxicology*, Vol. 29, No. 1, pp. 69-78
- [5] M. M. Lin, S. Li, H.-H. Kim, H. Kim, H. B. Lee, M. Muhammed and D. K. Kim, "Complete separation of magnetic nanoparticles via chemical cleavage of dextran by ethylene diamine for intracellular uptake", *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 20, No. 3, pp. 444-447
- [6] R. N. Kjellberg, T. Hanamura, K. R. Davis, S. L. Lyons and R. D. Adams, "Bragg-Peak Proton-Beam Therapy for Arteriovenous Malformations of the Brain", *New England Journal of Medicine*, Vol. 309, No. 5, pp. 269-274
- [7] R. Orecchia, A. Zurlo, A. Loasses, M. Krengli, G. Tosi, S. Zurrida, P. Zucali and U. Veronesi, "Particle beam therapy (hadrontherapy): basis for interest and clinical experience", *European Journal of Cancer*, Vol. 34, No. 4, pp. 459-468
- [8] D. R. Olsen, Ø. S. Bruland, G. Frykholm and I. N. Norderhaug, "Proton therapy - A systematic review of clinical effectiveness", *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 83, No. 2, pp. 123-132
- [9] L. H. Toburen, "Distributions in Energy and Angle of Electrons Ejected from Molecular Nitrogen by 0.3- to 1.7-MeV Protons",

Physical Review A, Vol. 3, No. 1, pp. 216-227

- [10] T. Igel, R. Pfandzelter and H. Winter, "Proton-induced Auger electrons from ultrathin Mn films on Fe (100)", Surface Science, Vol. 405 No. 2-3, pp. 182-191
- [11] F. Folkmann, C. Gaarde, T. Huus and K. Kemp, "Proton induced X-ray emission as a tool for trace element analysis", Nuclear Instruments and Methods, Vol. 116, No. 3, pp. 487-499
- [12] L. Milas, K. Kishi, N. Hunter, K. Mason, J. L. Masferrer and P. J. Tofilon, "Enhancement of Tumor Response to  $\gamma$ -Radiation by an Inhibitor of Cyclooxygenase-2 Enzyme", Journal of the National Cancer Institute, Vol. 91, No. 17, pp. 1501-1504
- [13] R. M. Kluck, E. Bossy-Wetzel, D. R. Green and D. D. Newmeyer, "The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis", Science, Vol. 275, No. 5303, pp. 1132-1136
- [14] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Föhling and F. Roland, "Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles", Journal of Magnetism and Magnetic Materials Vol. 201 No. 1-3, pp. 413-419