

수종의 암세포주의 저선량 방사선감수성에 관한 실험적 연구

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실

김민숙·고광준

목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
 - 참고문헌
 - 영문초록
 - 사진부도 및 설명

I. 서 론

암세포의 방사선감수성은 악성종양의 방사선 치료시 치료의 성패여부를 결정하는 가장 중요한 요인이다. 방사선치료는 방사선의 생물학적 작용에 의하여 조직이 파괴되는 성질을 이용하는데, 방사선이 생체조직에 흡수되면 물리적, 화학적 및 생화학적 과정에 의하여 생물학적 손상이 야기된다¹⁾. 방사선의 생물학적 효과는 생물의 종류에 따라서 또는 같은 개체에서도 연령, 조직의 종류, 세포의 증식과 분화정도, 세포주기내 시기 등의 생물학적 인자, 조사방사선의 선량, 선질, 선량분포, 선량을 등의 물리적 인자 그리고 조직의 산소분압과 온도 등의 환경인자에 의하여 영향을 받는다²⁾.

1940년 Wollman과 Lacassagne는 작은 virus가 큰 virus보다 방사선에 저항력이 있음을 보고

하였다. 그러나 Epstein(1953)은 virus의 크기보다는 DNA량과 방사선감수성 관계가 거의 비례 관계에 있다고 하였으며, Kaplan과 Moses(1964)는 virus뿐만 아니라 세균, 효모, 조류, 포유동물의 세포도 세포속에 함유되어 있는 핵산의 양이 많을수록 방사선감수성이 높다고 보고하였다³⁾.

생물의 종류에 따른 방사선감수성의 차이를 비교하기 위하여서는 방사선의 조사선량에 대한 세포의 생존곡선(survival curve)이 이용되는데, 세포의 생존곡선은 처음 1956년 Puck에 의하여 체외에서 HeLa세포를 대상으로 작성되었으나⁴⁾ 임상에는 실제 이용되지는 못하였다. 세포 생존곡선에서 D₀는 평균치사량 또는 37%생존을 선량(D₃₇)이라고 하며⁵⁾, 이는 생존곡선의 기울기와 일치되고 방사선감수성의 지표가 되며 기울기가 클수록 방사선감수성이 높아진다. 척추동물에서는 포유류의 방사선감수성이 높고 조류, 어류, 양서류 등은 일반적으로 낮다.

마우스는 연령에 따라서 방사선감수성이 현저히 다른데 Quastler(1945)의 연구에 의하면 출생 직후보다 생후 20~40일에 훨씬 감수성이 높다³⁾.

세포의 방사선감수성은 세포의 증식능력이 크고 세포분열과정이 길수록 그리고 형태적, 기능적 분화정도가 낮을수록 방사선감수성이 높아진다.

방사선의 조사선량은 조사대상의 방사선감수성, 체적 및 시간적 요소에 의존된다⁶⁾. 두경부암은 특히 선량의 증가에 의하여 국소제어율이 높

아지며 동일한 선량을 조사하는 경우에는 저선량을 장기간 조사하는 경우 암세포의 파괴를 증가시키면서 정상조직의 방사선손상을 감소시킬 수 있다. 한편 Hall(1973)은 특히 저선량에서는 세포의 치사율이 선량에 따라 심한 변화를 일으킨다고 하였다⁷⁾.

조직의 산소분압이 높을수록 방사선감수성이 높아지는데, 일반적으로 산소내에서는 무산소내보다 방사선감수성이 2~3배 높아진다³⁾.

방사선치료는 일반적으로 암세포가 정상세포보다 방사선의 장해를 받기 쉬운 성질을 이용하는데, 조사방사선에 대한 인접 정상조직의 장해를 허용하는 범위내에서 암세포를 사멸시키거나 적어도 증식되지 않는 정도까지 억제하는 것이다. 일반적으로 암세포의 방사선감수성은 그것이 유래하는 정상조직의 방사선감수성에 대체로 의존하는데, 림프조직으로부터 유래된 악성림프종이나 백혈병 등은 방사선감수성이 높으며, 대, 소타액선으로부터 유래되는 선암, 점막유표피종양 등은 방사선감수성이 약간 낮고, 결합조직, 근육, 골로부터 유래되는 섬유육종, 근육종, 골육종 등은 방사선에 저감수성을 나타낸다. 구강암은 대부분 구강점막으로부터 유래되는 편평세포암종이 80%이상을 차지하며 편평세포암종은 중등도 이상의 방사선감수성을 보여 방사선치료의 대상이 된다.

방사선감수성에 관한 연구로서 인체의 정상세포를 대상으로한 연구^{11,12)}가 있으며, 인체 암세포주를 대상으로한 연구로는 Hall등(1988)¹³⁾, Matthew등(1989)¹⁴⁾, Schroyen등(1990)¹⁵⁾, Kwok와 Sutherland(1991)¹⁶⁾ 등의 연구보고가 있다. 또한 Skarsgard등(1991)¹⁷⁾은 Hamster 암세포주에 대한 저선량의 방사선감수성실험을 한 바 있으며, Feinendegen등(1988)¹⁸⁾은 저선량방사선에 대한 생화학적 효과 및 세포기전에 대하여 연구 보고하였다.

한편 항암제감수성실험으로는 Drewinko등(1981)¹⁹⁾, Park등(1987)²⁰⁾, Carmichael등(1988)²¹⁾의 연구가 있으며, Carmichael과 Hickson(1990)²²⁾은 방사선과 항암제에 대한 세포저항성의 기전에 관하여, Baker등(1986)²³⁾은 인체 암세포주에 대한 항암제 및 방사선감수성실험을 한 바 있

다.

심과 이(1987)²⁵⁾는 인체 종양세포주에 대한 인터페론(IFN)의 시험관내 및 생체내 항암효과에 대한 연구, 이등(1990)²⁶⁾은 인체 암세포주에 대한 MDRI유전자발현도와 항암제감수성에 관한 연구를 한 바 있다.

저선량방사선에 대한 암세포의 방사선감수성 실험을 통하여 급성 생존곡선을 구할 수 있다.

특히 2Gy이상에서 암세포의 생존율과 불활성 선량(inactivation dose)은 인체 암세포주들의 방사선감수성 비교시에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 방사선감수성은 방사선치료효과와 높은 상관관계가 있으므로 중요하다고 보고되고 있다¹³⁾.

본 연구의 목적은 수종의 암세포주에 2, 4, 6, 8, 10Gy의 ⁶⁰Co γ -ray를 조사한 후, MTT 분석과 염색배제분석법[DEA]으로 암세포주의 생존곡선을 구하고, 이들을 비교 평가함으로써 향후 두경부암 환자의 방사선치료시 다소나마 도움을 주고자 하는데 있다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

(1) 암세포주

Mouse melanoma B16, human osteosarcoma MG-63, mouse lymphoma YAC-1 세포주를 10% D-FBS[Fetal Bovine Serum (M.A. Bio-products, 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. B16과 MG-63세포주는 단층(monolayer)으로 성장하는 반면, YAC-1세포주는 부유(floating)되어 성장하였다.

(2) 방사선조사

방사선조사 대상균을 96 well plates[MTT 분석]와 24 well plates[염색배제분석법:DEA]에 B16세포주는 2.5 $\times 10^4$ cells/ml, MG-63세포주는 3 $\times 10^4$ cells/ml, YAC-1세포주는 3.5 $\times 10^4$ cells/

ml 되도록 분주하였다. 실온에서 ^{60}Co γ -ray Irradiator ALDORADO 8(Atomic Energy Canada Ltd, Ottawa, Ontario, Canada)을 이용하여 선량을 210.2 cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10Gy를 단회조사하였다. SSD는 50cm, 조사야는 5×5 cm[MTT 분석법], 5×15 cm[염색배제분석법:DEA]이었다.

2. 실험방법

(1) MTT분석

방사선조사 후 각 암세포주를 4일간 배양한 후 실험에 적절한 세포주의 증식을 확인하였다.

흡광도측정 4시간 전에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2,-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 5mg/ml가 혼합된 배양액을 각 well당 200 μ l씩 넣어 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 100 μ l/well씩 넣어 15분간 실온에 방치한 후, 세포내 형성된 MTT formazan product를 용해하여 분광광도계 570nm에서 용해된 MTT의 흡광도를 scanning multiwell spectrophotometer(Enzyme-Linked Immunosorbant Assay Reader: Biotek Instruments, Inc. Burlington, VT)로 측정하여 세포독성 백분율을 구하고 대조군과 비교하였으며, 모든 실험은 triplicate하였다.

(2) 염색배제분석법[DEA]

DEA는 Weisenthal등²⁷⁾이 고안한 Novel Dye Exclusion Assay를 이용하였다. 실험에 적절한 세포주의 증식을 확인하고 culture flask[Nunclon Roskilide(Denmark)]내의 RPMI 배양액을 제거한 다음 culture flask면에 부착된 B16, MG-63 세포군의 분리를 위해 0.25% Trypsin 0.05M EDTA용액(200ml)으로 처리한 후 0.4% Trypan blue로 염색하였다. 한편 YAC-1세포주는 흔들어 사용한 후 0.4% Trypan blue로 염색하였다. 세포현탁액 1ml에 0.15M NaCl용액의 2% Fast green을 첨가하고 vortex mixer에서 교반하였다. 10분후 Pasteur pipet으로 잘 섞어준 후 8 drops(0.4ml)을 cytospin centrifuge로 슬라이드에 부착시켰다(1200rpm, 7분). 그후 modified H

& E로 이중염색하였다. Hematoxylin염색은 90초 동안 행하여졌으며, 3개의 7.5% ethanol에 5초가 넘지 않도록 빠르게 2회 담그고, Eosin염색은 30초 동안 탈수(95%, 95%, 100%, 100% alcohol, xylene, xylene)후 cover slip을 위치시켰다. 사멸된 세포는 brilliant green(Fast green)으로 염색되고 살아있는 세포는 H & E로 염색되었다. 제작된 slide는 100배로 사진을 촬영하여 각 표본당 총 500cell이상 count하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 대조군

B16, MG-63 세포주들은 분주 후 시간경과에 따라 침하하여 약 2시간 후에는 대부분이 well기저면에 부착하여 성장하였으며, YAC-1세포주는 배양액내에서 부유되어 성장하였다.

MTT분석에서 4일째 B16세포주의 optimal density는 $0.84 \pm 0.07 (2.5 \times 10^4 \text{ cells/ml})$, MG-63 세포주는 $0.77 \pm 0.03 (3 \times 10^4 \text{ cells/ml})$, YAC-1세포주는 $1.54 \pm 0.03 (3.5 \times 10^4 \text{ cells/ml})$ 이었다(Table 1,2,3).

2. 실험군

(1) MTT분석

방사선조사후 4일째 B16세포주는 4Gy를 제외한 전 선량에서, MG-63, YAC-1세포주는 전 선량에서 방사선량이 증가됨에 따라 세포생존율이 감소되었다(Table 1,2,3). B16세포주는 4Gy를 제외한 전 선량에서 완만한 기울기의 생존곡선을 나타내었으며(Fig.1), 10Gy에서 대조군과 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$).

MG-63 세포주는 전 선량에서 완만한 기울기의 생존곡선을 나타내었으며(Fig.1), 4,6,8,10 Gy에서 대조군과 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$). 한편 YAC-1세포주는 방사선에 민감한 반응을 보여 선량이 증가됨에 따라 생존률이 현저히 감소되었다(Fig.1). YAC-1세포주는 2,4,6,8,10Gy 전 선량에서 대조군과 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$).

또한 각각의 암세포주 사이에서도 유의한 차이를 보였는데, 2Gy에서 B16과 MG-63세포주 사이의 차이를 제외한 전 선량에서 암세포주 사이의 생존률의 차이를 보였다($P<0.05$).

(2) 염색배제분석법(DEA)

B16세포주는 4Gy를 제외한 전 선량에서, MG

Table 1. Radiation survival fraction of B16 cell line in MTT assay (optical density)

Dose	(Mean±S.D.)
Control	0.84±0.07
2 Gy	0.81±0.10
4 Gy	0.86±0.03
6 Gy	0.78±0.03
8 Gy	0.69±0.03
10Gy	0.61±0.01*

* Statistically significant($P<0.05$) by ANOVA and Scheffé test

Table 2. Radiation survival fraction of MG-63 cell line in MTT assay(optical density)

Dose	(Mean±S.D.)
Control	0.77±0.03
2 Gy	0.67±0.02
4 Gy	0.52±0.04*
6 Gy	0.46±0.03*
8 Gy	0.39±0.05*
10Gy	0.32±0.01*

* Statistically significant($P<0.05$) by ANOVA and Scheffé test

Table 3. Radiation survival fraction of YAC-1 cell line in MTT assay(optical density)

Dose	(Mean±S.D.)
Control	1.54±0.03
2 Gy	1.13±0.03*
4 Gy	0.49±0.07*
6 Gy	0.13±0.03*
8 Gy	0.11±0.01*
10Gy	0.07±0.01*

* Statistically significant($P<0.05$) by ANOVA and Scheffé test

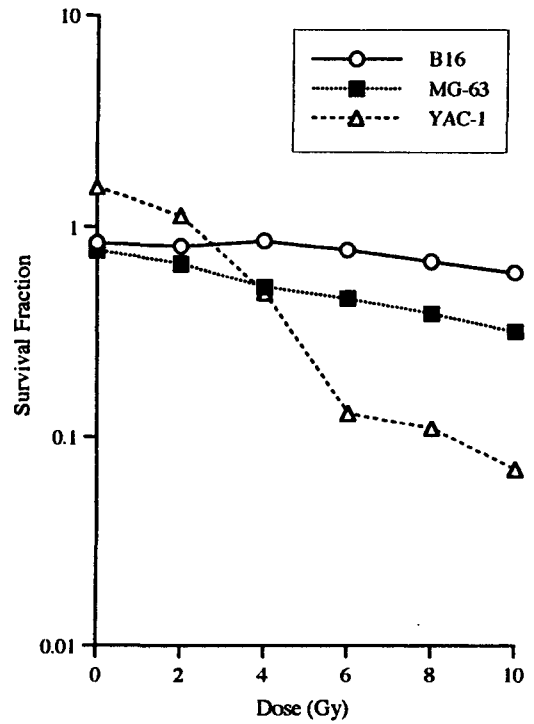


Fig. 1. Survival fraction of tumor cell lines in MTT assay

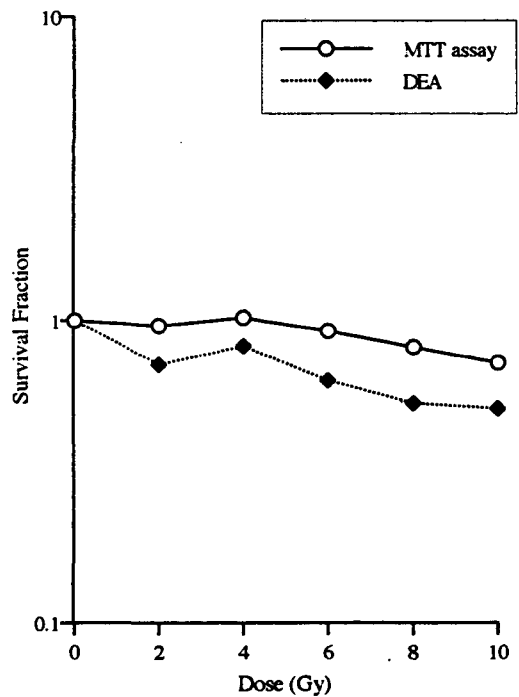


Fig. 2. Survival fraction of B16 cell line in MTT assay and DEA

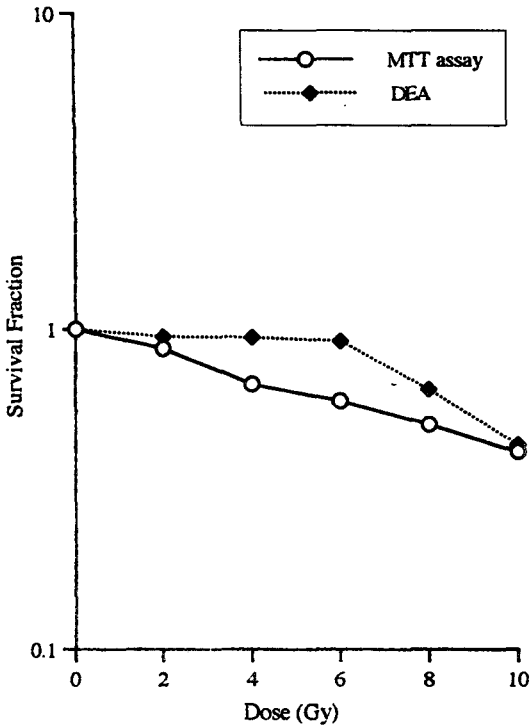


Fig. 3. Survival fraction of MG-63 cell line in MTT assay and DEA

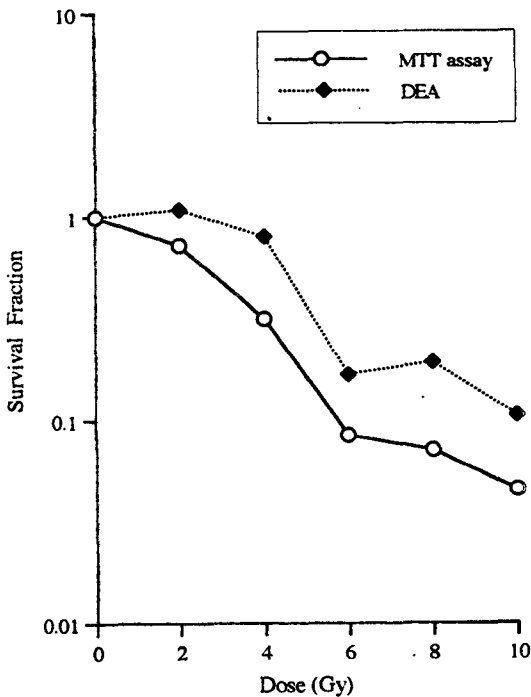


Fig. 4. Survival fraction of YAC-1 cell line in MTT assay and DEA

-63, YAC-1 세포주는 전 선량에서 방사선량이 증가됨에 따라 생존률이 감소되는 생존곡선을 보였다(Fig.2,3,4). MTT분석과 DEA비교시 B16, MG-63, YAC-1 세포주는 각각 0.845, 0.824, 0.906($P < 0.05$)의 상관관계수를 보여 높은 상관관계를 나타내었다.

IV. 총괄 및 고안

악안면 영역에 발생된 악성종양의 방사선치료는 이의 단독 또는 외과적 수술 및 화학요법과 병용하여 실시되고 있으며 특히 구강악안면 부위는 기능보존 그리고 심미적인 관점에서 외과적 수술요법에 비하여 방사선치료가 증가되고 있는 추세이다.

악성종양의 방사선치료시에는 암세포의 방사선감수성을 고려하여야 하는데 방사선 치료전 환자의 암조직으로부터 암세포를 분리하여 방사선감수성을 평가할 수 있다면 방사선치료의 효율도 증가시킬 수 있을 것이다. 그러나 생검시 암조직에 혼재된 정상세포를 분리시키고 암세포에 적절한 배양조건을 갖추어 주는데 어려움이 따른다. 따라서 실험실에서 계대배양된 암세포주는 순수암세포주에 일정한 배양조건을 갖추어 줄 수 있어 실험의 재현성이 높고, 방사선치료시 중요한 정보를 제공해줄 수 있을 것으로 생각된다. 많은 방사선 생물학적 개념은 설치류 세포들로부터 얻어진 실험결과에 기초하고 있다¹³⁾. 예를 들면 준치사손상으로부터의 회복(sublethal damage repair)은 Elkind와 Sutton(1959)³⁾의 Chinese hamster 세포를 대상으로 한 분할조사로부터 얻어진 실험결과이며, 분할조사에 의한 회복현상은 마우스, 돼지, 사람 등의 포유동물 세포를 대상으로 하여 연구되었다.

방사선분할조사시 생물학적 효과는 분할조사 간격내에서 일어나는 조직세포의 준치사손상으로부터의 회복이 정상조직에서 더 현저하고 세포분열과정에서의 재분포(redistribution), 재군집화(repopulation)와 종양조직에서 일어나는 재산소화(reoxygenation)가 방사선치료효과를 증가시켜 준다고 보고되고 있다²⁴⁾. 준치사손상으로부터의 회복은 종양조직에 비하여 정상조직에서

현저한데 그 이유에 대하여 Elkind등은 정상조직에서 항상성 조절(homeostatic control)능력이 있기 때문으로 설명하고 있다²⁴⁾. Xu등(1984)²⁸⁾은 대부분의 인체 조직세포에서 방사선에 의한 준치사 손상으로부터의 회복은 4시간 이내에 일어난다고 하였다. 또한 분할횟수 및 조사기간이 증가될수록 정상조직의 회복력이 증가되는 반면 종양조직의 손상으로부터의 회복력은 경미하여 치료의 효율을 높일 수 있다²⁾. 또한 저산소세포군을 함유한 종양조직세포군의 회복력은 정상조직에 비하여 현저히 저하되므로 분할조사에 의해 치료효과를 증대시킬 수 있다. 최근에는 하루에 두번 조사하는 hyperfractionation방법이 고안되고 있는데, 이것은 분할선량을 감소시킴으로써 준치사손상으로부터의 회복을 기대하는 것이다. 분할조사시 준치사손상으로부터 회복을 증명하기 위해서는 단회조사와 분할조사의 생존곡선을 작성하고 이때 두 조사방법에 따른 동일한 생물학적 효과를 나타내는 선량의 차이를 측정하여야 한다.

방사선조사에 의한 세포의 손상효과(cell killing effect)를 측정하기 위하여서는 세포생존곡선이 이용되고 있는데, 세포생존곡선 실험은 Puck등에 의하여 처음 시도되었으나 임상에 응용되지 못하였다⁴⁾. 그후 이의 임상적용을 위한 많은 실험이 시도되었으며^{1,13,23,28)}, 암세포의 고유 방사선감수성은 임상반응을 나타내는 지표가 될 수 있고 개개 암세포주의 방사선감수성실험은 방사선치료시 생존율을 예측하는데 유용한 것으로 보고되고 있다¹⁴⁾.

Malaise등(1989)¹²⁾는 인체 암세포는 정상조직세포에 비하여 방사선감수성이 훨씬 다양하게 발현되는데 이러한 암세포의 다양성은 유전형질상 서로 다른 이질성을 지닌 세포들로 구성되었기 때문이라고 하였다. 환자 개개인에 따른 차이뿐만 아니라 동일 환자에서 적출된 종양도 서로 유전형, 표현형도 달리하고 있는데 이와 같은 차이는 암의 진행상태, 전이 여부, 염색체형, 세포표면의 항원성, 면역성, 시험관내 성장특성, 바이러스 수용체 유무 그리고 생화학적 성상등에 의하여 나타난다²⁹⁾.

일반적으로 osteosarcoma세포는 방사선감수

성이 낮으며 lymphoma세포는 방사선감수성이 높은 것으로 알려져 있다. 한편 melanoma세포는 방사선감수성이 낮은 것으로 알려지고 있으나 방사선감수성 실험 및 실제 임상에서 방사선감수성이 매우 다양하여 준치사손상으로부터 회복되는 양도 차이가 많다³⁰⁾. 따라서 특히 melanoma는 방사선치료시 방사선감수성 실험 후 치료 가능 여부를 결정해야 할 것으로 생각된다.

암세포의 고유 방사선감수성 실험은 저선량의 급성 생존곡선에서 잘 관찰될 수 있다. 저선량방사선은 생물학적으로 확실한 효과를 나타내는 데에는 다소 미흡한 것으로 알려지고 있다. 그러나 잠재성 악성종양(subclinical disease)은 저선량방사선으로도 충분히 제어할 수 있다¹⁸⁾. 세포핵 또는 세포내에 흡수된 방사선은 전리방사선의 양에 의존하며 세포의 미세구조에 확률적으로 작용한다. 2Gy이상에서 평균불활성선량(mean inactivation dose)에서의 생존율은 방사선감수성을 잘 나타내주고 이러한 방사선감수성은 방사선치료시의 반응과 밀접한 관계를 가지고 있다¹⁴⁾.

본 연구에서는 B16세포주의 4Gy를 제외한 전선량에서 방사선량의 증가에 따라 세포주의 생존율은 감소되었다. 또한 B16세포주의 방사선감수성은 MG-63, YAC-1세포주보다 낮았으며, 특히 YAC-1세포주는 선량이 증가됨에 따라 생존율이 현저히 감소되어 기울기가 큰 생존곡선을 나타내었다. 각각의 암세포주의 생존율은 MTT 분석에서 B16세포주는 72.6~100(%), MG-63세포주는 41.5~87.0(%), YAC-1세포주는 31.8~72.8(%), DEA에서 B16세포주는 51.5~71.8(%), MG-63세포주는 43.7~94.8(%), YAC-1세포주는 10.5~100(%), 이었다.

방사선조사 후 세포들은 한번 또는 두번 세포분열을 하는 동안 사멸되거나 분열 후에 사멸되는데 이와 같이 세포분열을 통하여 분열사에 이른다. 방사선에 의한 세포의 상해는 핵의 높은 감수성 때문이며 DNA가 표적이 되는 것으로 알려지고 있다. 따라서 방사선에 의한 세포사는 주로 DNA의 한줄 사슬(single strand) 또는 두줄 사슬(double strand)이 절단됨으로써 세포분열을 하지 못하고 세포사에 이른다³⁾. 방사선을 조사받으면 세포는 세포분열지연이 일어나며, 이

때 방사선량이 증가될수록 초기의 세포분열 감소로부터 회복까지의 시간이 길어져 분열지연이 증가되고 DNA합성량도 감소되며 G₂기의 세포들이 축적된다. 방사선에 의한 세포의 손상이 회복되면 세포는 다시 분열기에 들어간다. 한편 분열을 수반하지 않는 세포의 사멸을 간기사라 하며, 세포분열을 하지 않는 신경모세포에서는 비교적 저선량에 의해 수시간내에 간기사에 이른다. 따라서 방사선조사 후 상당한 시간이 경과된 후 세포는 분열사에 의하여 손상이 일어나고 군집(population)으로부터 이탈된다. 이러한 결과는 방사선에 의한 생존율을 측정하기 위해서는 충분한 시간이 경과되어야 한다는 것을 의미한다.

따라서 본 연구에서는 각각의 암세포주에 대한 적절한 세포수를 결정하기 위한 예비실험을 실행하였으며, 방사선에 의한 세포사까지의 충분한 시간을 부여하고 살아있는 세포와 사멸된 세포를 잘 관찰하기 위하여 방사선조사 4일 후 암세포주의 생존율을 구하였다. 배양된 암세포주에 대한 방사선조사 후의 세포독성을 검사하는 방법으로는 세포생사 판정을 통한 염색배제 분석법(Dye Exclusion Assay:DEA), 생체염색의 neutral red에 근거한 비색검사법인 Neutral Red[NR]분석법, 세포대사억제를 평가하는 Tetrazolium-based color-imetric[MTT]분석법, 효소분석법, ³H Thymidine을 이용한 DNA분석법 등이 있다.

세포독성 반응에 대한 MTT분석은 처음 Mosmann(1983)⁸⁾에 의하여 고안되었는데 그후 MTT분석은 정량적으로 세포독성을 평가하고 성장억제 lymphokines을 평가하는데 이용되어 왔다. 1987년 Carmichael과 Hickson²²⁾은 방사선 감수성 및 항암제감수성실험시 MTT를 평가하였으며 Park등(1987)²⁰⁾은 인체 암세포주, Carmichael등(1988)²¹⁾은 인체 폐암세포주, Camp-ling등(1988)³¹⁾은 인체 leukemic blast cell의 항암제감수성실험시 MTT분석을 평가한 바 있다. Carmichael등(1988)²¹⁾은 MTT분석이 정확하고 빠르며 단순한 분석법으로서 유용하게 이용될 수 있다고 하였다. ³H Thymidine을 이용한 자가 방사기록법(autoradiography)은 DNA에 집적되

는 방사능의 양을 측정함으로써 DNA합성능을 평가할 수 있는 방법이지만 이 방법은 방사능 오염의 가능성이 있는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 방사선감수성을 비교적 빠르고 정확하게 평가할 수 있는 MTT분석과 세포생사판정을 평가하기 위한 염색배제분석법(DEA)이 이용되었다.

MTT분석은 살아있는 세포의 미토콘드리아의 호박산탈수소효소(succinyl dehydrogenase)에 의하여 용해성 MTT tetrazolium염이 청색의 불용성 MTT formazan으로 환원되는데²⁹⁾, formazan은 용해성이 낮아 최근에는 Wilson이 추천한 용해제로 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 사용함으로써 용해성을 증가시켜 spectrophotometer로 흡광도를 측정한다.

본 연구에서는 formazan용해제로 DMSO를 사용하였으며 spectrophotometer로 흡광도 측정시 570nm의 흡광도를 이용하였다.

Carmichael등(1987)¹⁰⁾은 방사선감수성실험시 암세포의 생존곡선을 작성하는데 MTT분석과 DEA는 높은 상관관계를 나타낸다고 보고하였다. 이는 방사선감수성에 대한 실험실결과와 방사선치료결과와의 관계를 알기위한 방법으로서 MTT분석과 DEA사용이 유용하다는 것을 나타낸다.

본 연구 결과도 B16, MG-63, YAC-1 세포주는 각각 0.845, 0.824, 0.906의 상관계수를 보여 MTT분석과 DEA는 높은 상관관계를 나타내었다. 또한 MTT분석 결과 B16, MG-63, YAC-1 세포주의 흡광도의 표준편차는 각각 5.66%, 6.17%, 10.89%를 나타내었다.

암세포의 방사선감수성을 측정하는데 MTT 분석은 세포배양기간이 길어질수록 배지의 증발을 유발할 수 있어 최소한 일주일에 한번 또는 두번의 배지교환이 이루어져야 한다. 그러나 배지교환시에는 오염에 의해 tetrazolium의 양이 감소될 수 있으며, 동시에 세포수의 감소를 유발할 수 있으므로 본 실험기간 중에는 배지교환은 하지 않았다. 또한 MTT분석은 실제 임상에서 응용하기에는 많은 제약이 따르므로 모든 환자에 대하여 보다 정확하고 빠르며 단순하고 경제적인 분석법이 개발되어야 할 것으로 사료된다.

DEA는 많은 세포가 사멸될 경우 살아있는 세포수가 적어 판독시 오차가 크게 나타날 수 있으며, dye자체의 세포독성이 있고 작업시간이 길어 살아있는 세포가 염색될 수 있는 단점이 있다. Weisenthal등(1983)²⁷⁾은 fast green H & E 이중염색법을 이용하여 살아있는 세포와 사멸한 세포를 구별하는 Novel Dye Exclusion Assay를 소개하였는데, 이 방법은 특히 불균질 세포집단의 감수성 실험시 독립적인 세포독성을 나타내는 단일 세포군의 평가에 유용하다.

본 연구에서도 Weisenthal등이 소개한 Novel Dye Exclusion Assay를 이용하였다. 그러나 이 분석법 역시 작업시간이 길고 수작업시 세포수의 차이가 나타날 수 있어 암세포주의 방사선감수성실험에는 부적절한 것으로 생각된다.

방사선조사에 의한 방사선감수성평가시 MTT 분석과 DEA는 높은 상관관계를 보이는 분석법으로서 많은 장점이 있지만 보완해야할 문제점도 많은 것으로 사료된다. 따라서 향후 임상적으로 유용하게 이용될 수 있는 새로운 분석법의 개발이 요구된다.

또한 본 연구는 단회조사시 암세포주에 대한 방사선감수성실험으로서 향후 분할조사에 대한 효과 및 항암제감수성과 방사선감수성을 동시에 평가하는 실험이 이루어져야할 것으로 사료된다.

V. 결 론

암세포주의 저선량방사선에 대한 세포독성반응을 알아보기 위하여 실험실에서 배양된 B16, MG-63, YAC-1 세포주에 ⁶⁰Co γ -ray Irradiator ALDORADO 8을 이용하여 선량을 210.2 cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사하였다.

방사선조사 후 4일째의 세포생존율을 MTT분석과 염색배제분석법(DEA)으로 구하여 각각의 세포생존곡선을 작성하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MTT분석에서 B16세포주는 4Gy를 제외한 전 선량에서 완만한 기울기의 생존곡선을 나타내

었으며, 10Gy에서 대조군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05).

2. MTT분석에서 MG-63세포주는 전 선량에서 완만한 기울기의 생존곡선을 나타내었으며, 4, 6, 8, 10Gy에서 대조군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05).

3. MTT분석에서 YAC-1세포주는 선량이 증가됨에 따라 급격한 생존곡선을 나타내었으며, 2, 4, 6, 8, 10Gy 전 선량에서 대조군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05).

4. MTT분석시 2Gy에서는 B16과 MG-63세포주의 세포독성의 차이는 없었으나 그외 전 선량에서 암세포주 사이의 세포독성의 차이를 보였다(P<0.05).

5. MTT분석과 염색배제분석법의 비교시 B16, MG-63, YAC-1 세포주는 각각 0.845, 0.824, 0.906(P<0.05)의 상관계수를 보여 높은 상관관계를 나타내었다.

REFERENCES

1. Pizzarello, D.J. and Witcofski, R.L.: Basic radiation biology, 2nd ed., pp.20-29, Lea and Febiger, Philadelphia, 1975.
2. 足立忠 : 放射線醫學, 第 7版, pp.137-157, 醫學書院, 1977.
3. 李相奭, 放射線生物學, 高文社, pp.130-134, 1987.
4. 허승재, 박찬일 : 마우스공장 소낭선세포의 방사선감수성에 관한 실험적 연구, 대한치료방사선학회지 3:9, 1985.
5. Goaz, P. W. and White, S. C. : Oral radiology, 3rd ed., pp.44-69, C.V. Mosby, St. Louis, 1994.
6. Fowler, J. F. and Stern, B. E. : Dose-rate effects: some theoretical and practical consideration. Br.J. Radiol. 33:389-395, 1960.
7. Hall, E. J.: Radiobiology for the radiologist, 1st ed., pp.41-60, C.V. Mosby, St. Louis, 1982.
8. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods 65:55-63, 1983.
9. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing,

- Cancer Research 47:936-942, 1987.
10. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B.: Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay : Assessment of radiosensitivity, Cancer Research 47:943-946, 1987.
 11. Arlett, C. F. and Harcourt, S. A. : Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains, Cancer Research 40:926-932, 1980.
 12. Malaise, E. P., Deschavanne, P. J. and Fertil, B. : The relationship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells, Int. J. Radiat. Biol. 56:597-604, 1989.
 13. Hall, E. J., Marchese, M., Hel, T. K. and Zaider, M. : Radiation response characteristics of human cells in vitro, Radiation Research 114:415-424, 1988.
 14. Matthews, J. H. L., Meeker, B. E. and Chapman, J. D. : Response of human tumor cell lines in vitro to fractionated irradiation, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16:133-138, 1989.
 15. Schroyens, W., Tueni, E., Dodion, P., Bodeckee, R., Stoessel, F. and Klastersky, J. : Validation of clinical predictive value of in vitro colorimetric chemosensitivity assay in head and neck cancer, Europ. J. Cancer 26:834-838, 1990.
 16. Kwok, T. T. and Sutherland, R. M. : The Influence of cell-cell contact on radiosensitivity of human squamous carcinoma cells, Radiation Research 126:52-57, 1991.
 17. Skarsgard, L., Harrison, I. and Durand, R. E. : The Radiation response of asynchronous cells at low dose; Evidence of Substructure, Radiation Research 27:248-256, 1991.
 18. Feinendegen, L. E., Bond, V. P., Booz, J. and Muhlensiepen, H.: Biochemical and cellular mechanisms of low-dose effects, Int. J. Radiat. Biol. 53:23-27, 1988.
 19. Drewinko, B., Patchen, M., Yang, L. Y. and Barlogie, B. : Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferation and nonproliferating human tumor cells, Cancer Research 41:2328-2333, 1981.
 20. Park, J. G., Karamer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. : Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay, J. Cancer Research 47:5875-5879, 1987.
 21. Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Johnson, B. E., Glatstein, E. and Minna, J. D. : Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay, Br. J. Cancer 57:540-547, 1988.
 22. Carmichael, J. and Hickson, I. D. : Keynote address : Mechanisms of cellular resistance to cytotoxic drugs and X-radiation, Int.J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 20:197-202, 1991.
 23. Baker, F. L., Spitzer, G., Ajani, J. A., Brock, W. A., Lukeman, J., Pathak, S., Tomasovic, B., Thielvoldt, D., Williams, M., Vines, C. and Tofilon, P. : Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor using cell-adhesive matrix and supplemented medium, Cancer Research 46:1263-1274, 1986.
 24. 고병희, 함창곡, 김정진 : 단일조사와 분할조사시 마우스 공장 소 낭세포의 방사선효과에 관한 실험적 연구, 대한치료방사선학회지 3:1-8, 1985.
 25. 심우남, 이원영 : 사람종양 세포주에 대한 rHu IFN- α A의 시험관내 및 생체내 항암 효과, 대한면역학회지 9:249-257, 1987.
 26. 이경영, 박재갑, 황이숙, 김진복 : 인체 암세포주의 MDRI 유전자 발현도와 항암제 감수성에 대한 연구, 대한암학회지 22:37-47, 1990.
 27. Weisenthal, L.M., Marsden, J.A., Dill, P.L. and Macaluso, C.K.: A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors, Cancer Research 43:749-757, 1983.
 28. Xu, F. X., Van der Schueren, E. and Ang, K. K. : Acute reactions of the lip mucosa of mice to fractionated irradiations, Radiotherapy and Oncology 1:369-374, 1984.
 29. 이창혜, 이봉기, 이원영, 김주덕 : 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 Adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포 특성, 연세의대 논문집 16:180, 1983.
 30. Weichselbaum, R. R., Schmit, A. and Little, J. B. : Cellular repair factors influencing radiocurability of human malignant tumours, Br. J. Cancer 45:10-16, 1982.
 31. Campling, B. G., Pym, J., Galbraith P. R. and Cole, S. P. C. : Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human

- leukemic blastic cells, *Leukemic Research* 12: 823-831, 1988.
32. 최영희, 박창일, 한만청 : 반복온열요법이 방사선조사효과에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, *대한치료방사선학회지* 2:1-9, 1984.
 33. Curt, G. A., Clendeninn, N. J. and Chabner, B. A. : Drug resistance in cancer, *cancer treatment reports* 68:87-99, 1984.
 34. Dale, R. G., Huczkowski, J. and Trott, K. R. : Possible dose rate dependance of recovery kinetics as deduced from a preliminary analysis of the effects of fractionated irradiations at varing dose rates, *Br. J. Radiol.* 61:153-157, 1988.
 35. Han, A., Hill, C. K. and Elkind, M. M. : Repair of cell killing and neoplastic transformation at reduced dose rates of Co- γ rays, *Cancer Research* 40:3328-3332, 1980.
 36. Hong, W. K., Shapshay, S. M., Bhutani, R., Craft, M. L., Ucmakli, A., Yamaguchi, K. T., Vaughan, C. W. and Strong, M. S.: Induction chemotherapy in advanced squamous head and neck carcinoma with high-dose cis-platinum and bleomycin infusion, *Cancer* 44:19-25, 1979.
 37. Hoshi, M., Antoku, S., Nakamura, N., Russell, W. J., Miller, R., Sawada, S., Mizuno, M. and Nishio, S. : Soft X-ray dosimetry and RBE for survival of Chinese V79 cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 54:577-591, 1988.
 38. Huh, S. J. and Park, C. I. : Radiosensitivity and dose-survival characteristics of crypt cells of mouse jejunum, *J. Korean Soc. Ther. Radiol.* 3:9-12, 1985.
 39. 조철구, 고경환, 강기현, 박찬일 : 두경부악성종양의 방사선치료 계획에 있어서 전산화단층촬영의 이용에 관한 연구, *대한치료방사선학회지* 1:47-53, 1983.
 40. Kang, C. H., Kum, S. K. Shin, S. O. and Kim, M. S.: Acute response to Co-60 total body irradiation(TBI) with 600.cGy at 3 different dose rates in the mice, *J. Korean Soc. Ther. Radiol.* 8:151-154, 1990.
 41. 금기창, 이창걸, 김귀언, 이경희 : 진행된 후두암과 하인두암의 환자에서 유도화학 요법 후 방사선 치료와 수술 후 방사선 치료의 성적 비교 및 고찰, *대한치료방사선학회지* 11:277-283, 1993.
 42. 이 열, 서창해, 강기현 : 두경부악성종양에서의 전산화단층촬영의 진단적 가치 -비인두악성종양을 중심으로- , *대한치료방사선학회지* 2:139-148, 1984.
 43. Limon, J., Lundgren, R., Elfving, P., Heim, S. Kristoffersson, U., Mandahl, N. and Mitelman, F. : An improved technique for short-term culturing of human prostatic adenocarcinoma tissue for cytogenetic analysis, *Cancer Genet. Cytogenet.* 46:191-199, 1990.
 44. Mitchell, J. B., Bedford, J. S. and Bailey, S. M. : Dose-rate effects on the cell cycle and survival of S3 HeLa and V79 cells, *Radiation Research* 79:520-536, 1979.
 45. Nilsson, P., Thames, H. D. and Joiner, M. C. : A generalized formulation of the 'incomplete-repair' model for cell survival and tissue response to fractionated low dose-rate irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.* 57:127-142, 1990.
 46. 오원용, 조관호, 서창옥, 김귀언 :두경부 선암의 생물학적 특성과 치료, *대한치료방사선학회지* 2:191-202, 1984.
 47. Parker, L., Skarsgard, L. D. and Emmerson, P. T. : Sensitization of anoxic mammalian cells to X-Rays by triacetoneamine N-Oxyl. survival and toxicity studies, *Radiation Research* 38:493-500, 1969.
 48. Peacock, J. H., Cassoni, A. M., McMillan, T. J. and Steel, G. G. : Radiosensitivity human tumour cell lines may not be recovery deficient, *Int. J. Radiat. Biol.* 6:945-953, 1988.
 49. Peacock, J. H., Eady, J. J., Edwards, S., Holmes, A., McMillan, T. J. and Steel, G. G. : Initial damage or repair as the major determinant of cellular radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol.* 5: 543-547, 1989.
 50. Shadley, J. D. and Wiencke, J. K. : Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity, *Int. J. Radiat. Biol.*, 56:107-118, 1989.
 51. 심재원, 류성렬, 고경환, 조철구, 윤형근, 김재영 : 구강암의 방사선치료:대한치료방사선학회지 11:267-275, 1993.
 52. Sindelar, W. F., Kinsella, T., Tepper, J., Travis, E. L., Rosenberg, S. A. and Glastein, E.: Experimental and clinical studies with intracurative radiotherapy, *Sugery, Gynecology & Obstetrics* 157:205-219, 1983.
 53. Steel, G. G., Down, J. D., Peacock, J. H. and Stephens, T. C. : Dose-rate effects and the repair of radiation damage, *Radiotherapy and Oncology*

- 5:321-331, 1986.
54. Steel, G. G. and Peacock, J. J. : Why are some human tumors more radiosensitive than others? *Radiotherapy and Oncology* 15:63-72, 1989.
55. Theames, H. D., Bentzen, S. M., Turesson, I., Overgaard, M. and Van Den Borgaert, W. : Fractionation parameters for human tissues and tumors, *Int. J. Radiat. Biol.* 56:701-710, 1986.
56. Van Rotterdam, A., Barendsen, G. W. and Gaiser, J. F. : Radiosensitivity of cells in recurrent experimental tumours and the effectiveness of tumour retreatment, *Radiotherapy and Oncology* 8:171-176, 1987.
57. Weichselbaum, R. R., Epstein, J. and Little, J. B. : In vitro cellular radiosensitivity of human malignant tumours, *Europ. J. Cancer* 12:47-51, 1976.
58. Withers, H. R. : Biologic basis for altered fractionation schemes, *Cancer* 55:2086-2095, 1985.

-ABSTRACT-

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE LOW-DOSE RADIOSENSITIVITY OF TUMOR CELL LINES

Min-Sook Kim, Kwang-Joon Koh

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Chonbuk National University

The purpose of this study was to aid in the radiation therapy of head and neck cancer patients.

For this study, radiation survival curves were generated for B16, MG-63 and YAC-1 cell lines using semiautomated MTT assay and Dye Exclusion Assay. Irradiation of 2, 4, 6, 8, 10Gy were delivered at room temperature at a dose rate of 210.2cGy/min using ⁶⁰Co γ -ray Irradiator ALDORADO 8. The viable cells were determined for each radiation dose and compared to control values.

The obtained results were as follows:

1. There was significantly different absorbance at 10Gy on B16 cell line in MTT assay(P<0.05).
2. There was significantly different absorbance at 4, 6, 8, 10Gy on MG-63 cell line in MTT assay(P<0.05).
3. YAC-1 cell line was more sensitive than B16 or MG-63 cell line to all doses of radiation(P<0.05).
4. There was significantly different absorbance among all tumor cell lines except between B16 and MG-63 cell line at 2Gy in MTT assay(P<0.05).
5. Good correlation was obtained between MTT assay and DEA(P<0.05).

The efficient of correlation of B16, MG-63 and YAC-1 cell line was 0.845, 0.824 and 0.906, respectively.

논문사진부도

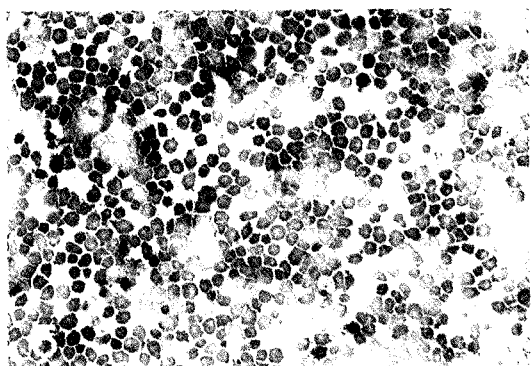


Fig. 5. Surviving B16 cells in DEA(2Gy)

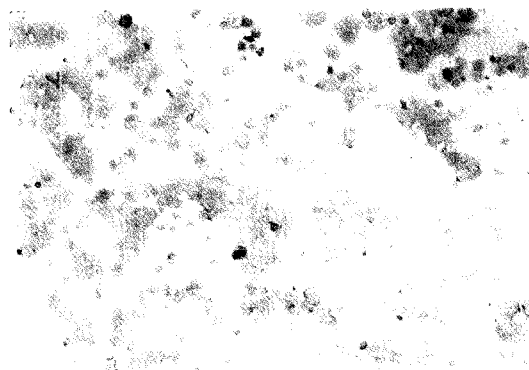


Fig. 6. Surviving B16 cells in DEA(10Gy)

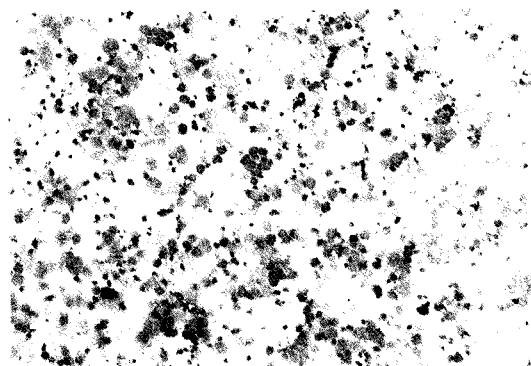


Fig. 7. Surviving MG-63 cells in DEA(2Gy)

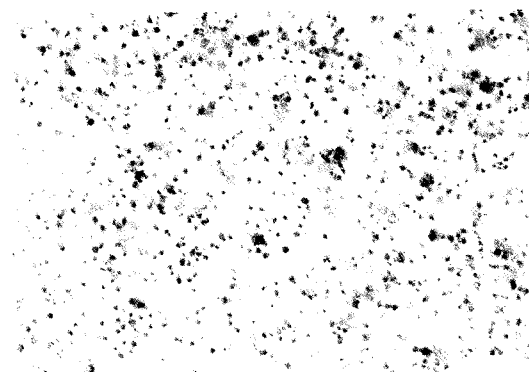


Fig. 8. Surviving MG-63 cells in DEA(10Gy)

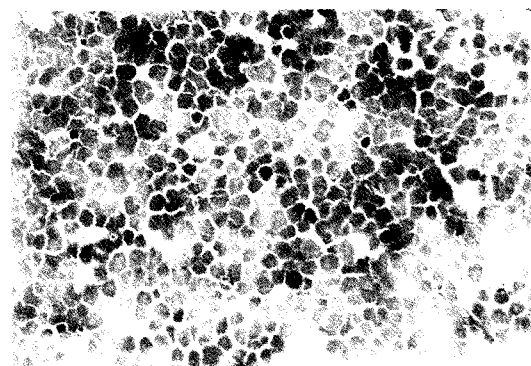


Fig. 9. Surviving YAC-1 cells in DEA(2Gy)

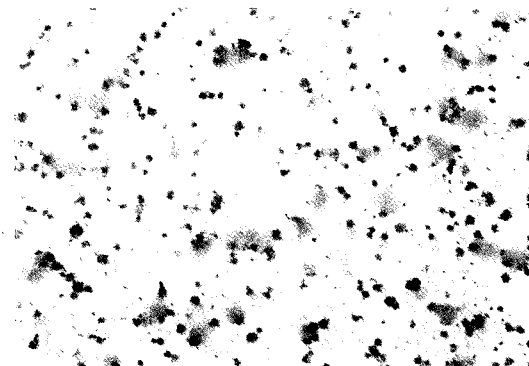


Fig.10. Surviving YAC-1 cells in DEA(10Gy)