

B16세포주의 방사선 및 항암제감수성에 관한 실험적 연구

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실

나 승 목 · 고 광 준

목 차

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

I. 서 론

최근 종양학분야는 괄목할 만한 발전이 이루어졌지만 암환자의 생존율은 만족스럽지 못하다. 암환자 사망의 주원인은 50-60%가 국소제어의 실패이며 다음으로 원격전이, 이차암 등이다¹⁾.

방사선치료는 많은 국소성 충실성 종양의 치료에 효과적이지만, 그 효과는 암세포의 방사선 감수성과 주위 정상조직의 내성에 의해 많은 영향을 받는다. 따라서 암조직의 국소제어율을 증가시킴으로써 암환자의 생존율을 높이기 위해 많은 노력을 기울여 왔으며, 방사선치료도 이의 단독치료보다는 항암제를 병용함으로써 암세포에 대한 방사선의 효과를 증가시키고 국소제어율도 높일 수 있다²⁾. 한편 방사선감수성 및 항암제감수성은 암환자 치료의 성패여부를 결정하는 중요한 요인이 되므로, 암환자의 병용치료시에는 암세포의 방사선감수성과 항암제감수성을 고

려하여야 한다.

일반적으로 암세포의 방사선감수성은 암세포가 유래하는 정상조직의 방사선감수성에 의존한다. 림프조직으로부터 유래되는 악성림프종이나 백혈병 등은 방사선감수성이 높으며 두경부암의 80%이상을 차지하는 편평세포암종은 중등도 이상의 방사선감수성을 보인다. 또한 대,소 타액선으로부터 유래되는 선암, 점막유표피종양 등은 방사선감수성이 중등도 이하이며 결합조직, 근육, 골로부터 유래되는 섬유육종, 근육종, 골육종 등은 방사선감수성이 낮다.

방사선감수성에 관한 연구로서는 인체의 정상세포를 대상으로 한 Greear등(1933)³⁾, Wurm등(1994)⁴⁾의 연구보고가 있는데, Hall등(1988)⁵⁾, Matthews등(1989)⁶⁾, Schroyens등(1990)⁷⁾, Kwok과 Sutherland(1991)⁸⁾ Girinsky등(1992)⁹⁾은 Hamster 암세포주에 대한 저선량 방사선감수성실험을 한 바 있고, Feinendegen등(1988)¹⁰⁾은 저선량방사선에 대한 생화학적 효과 및 세포기구에 관하여 연구, 보고하였다. 또한 O'Brien등(1991)¹¹⁾, Ang등(1994)¹²⁾은 두경부 악성흑색종에 대한 방사선 치료효과를 보고하였으며, Burnet등(1992)¹³⁾은 인체 섬유모세포를 대상으로 방사선조사 후 in vitro/in vivo상관관계를 보고한 바 있다. 악성흑색종은 일반적으로 방사선감수성이 낮은 것으로 알려져 있으나 방사선감수성실험 및 방사선치료시 다양한 방사선감수성을 보인다. 따라서 특히 악성흑색종은 방사선감수성실험 후 방사선치료

가능여부를 결정할 필요가 있다.

Fertil과 Malaise(1981)¹⁴⁾, Deacon 등(1985)¹⁵⁾은 2 Gy에서의 생존율을 측정한 암세포의 고유 방사선감수성은 방사선치료시 암조직반응에 중요한 역할을 할 수 있다고 보고하였다. 한편 암환자의 치료시 화학요법 단독으로는 암세포만의 세포독성효과를 가져오지는 못하였지만 방사선 치료 또는 외과적 수술요법과 병용함으로써 국소제어율을 증가시킬 수 있었다. 특히 cisplatin은 방사선의 세포독성을 증가시키는 약제로 보고되어 유도화학요법시 방사선감수성을 극대화하기 위해 이용되었다²⁾.

항암제감수성에 관하여는 Drewinko등(1981)¹⁶⁾, Rozenzweig등(1984)¹⁷⁾, Park등(1987)¹⁸⁾, Carmichael등(1988)¹⁹⁾의 보고가 있다. Bleomycin, vindesine, 5-fluorouracil, hydroxyurea 등과 더불어 1980년대 초기에 개발되어 원발암과 림프절에 현저한 세포독성반응을 보이는 cisplatin-5FU와 같은 새로운 항암제와의 복합요법의 의하여 진행된 두경부암 치료에 대한 화학요법의 역할을 재평가하게 되었다.

한편 암조직의 이질성(heterogeneity)으로 볼 때 방사선치료, 화학요법, 또는 이들의 병용요법은 종양의 특성(DNA ploidy, proliferating index, doubling time, predictive test)을 나타내는 실험실소견과 환자의 정신적, 육체적인 건강을 기초로 하여 개개인에 맞는 치료법이 이용되어야 한다.

Ensley 등²⁰⁾은 일련의 두경부암환자에 대한 복합화학요법의 초기반응으로 다음의 방사선치료의 반응을 예측할 수 있다고 하였다. 즉 화학요법에 반응을 나타낸 암환자는 방사선치료의 반응도 매우 큰 반면 초기 화학요법에 반응을 보이지 않은 암환자는 다음의 방사선치료에도 거의 반응을 나타내지 않았음을 보고하였다. Glick 등도 cisplatin과 bleomycin을 투여한 후 부분적인 반응을 보인 환자의 67%에서 방사선치료시 완전반응을 보인 반면, 화학요법에 부분적인 반응을 보이지 않은 군에서는 다음의 방사선치료에도 20%의 완전반응만을 보였다고 보고하였다.

한편 Greara등(1993)²¹⁾은 in vitro 정상 피부 섬유모세포의 방사선감수성은 방사선치료 후 in

vivo 정상조직의 만성반응과 관련성이 매우 컸으나 급성반응과는 상관관계가 없었다고 보고한 바 있다.

암환자의 치료 전 암조직으로부터 암세포를 분리하여 방사선 및 항암제감수성을 정확히 평가할 수 있다면 암환자의 치료효과를 증대시킬 수 있을 것이다. 그러나 생검시 조직으로부터 정상세포를 잘 분리시키고 암세포의 배양조건을 적절히 유지하기에는 많은 어려움이 있다. 따라서 계대배양한 암세포주를 대상으로 일정한 배양조건하에서 방사선 및 항암제감수성을 실험실 실험을 통하여 평가할 필요가 있다.

또한 심과 이(1987)²²⁾는 인체 종양세포주에 대한 인터페론의 in vitro/in vivo 항암효과, 이등(1990)²³⁾은 인체 암세포주에 대한 Multidrug resistance(MDR)1 유전자발현도와 항암제감수성에 관하여 연구, 보고한 바 있다. Carmichael과 Hickson(1991)²⁴⁾은 방사선과 항암제에 대한 세포 내성의 기구, Baker 등(1986)²⁵⁾은 인체 암세포주에 대한 항암제감수성 및 방사선감수성에 관하여 보고 한 바 있다. Ensley등(1984)²⁰⁾, Samuel등(1989)²⁶⁾은 두경부 편평세포암종에 대한 화학요법과 방사선치료효과, Jaulerry등(1992)¹⁾은 두경부암에 대한 유도화학요법의 효과에 관하여 보고 하였다.

세포대사억제의 평가법인 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2,-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide]분석법은 정량적으로 단기간의 세포독성반응을 평가하는데 유용하게 이용되고 있다. Carmichael과 Hickson(1987)²⁴⁾은 방사선 감수성 및 항암제 감수성실험시 MTT를 평가하였으며 Park등(1987)¹⁸⁾은 인체 암세포주, Carmichael등(1988)은 인체 폐암세포주, Campling 등(1988)²⁷⁾은 인체 백혈병모세포(leukemic blast cell)의 항암제감수성실험시 MTT분석을 평가한 바 있다.

따라서 본 연구의 목적은 murine melanoma B16 세포주에 대한 방사선감수성 및 항암제감수성실험을 통하여 향후 두경부암환자의 치료시 치료반응을 예측하는데 다소나마 도움을 주고자 하는데에 있다.

Table 1. Radiation Surviving Fraction of B16 in MTT assay

Dose	Cell line	B16 (Mean±S.D.)
Control		1.04±0.05
2Gy		0.97±0.06
4Gy		0.82±0.07*
6Gy		0.81±0.05*
8Gy		0.81±0.07*
10Gy		0.70±0.03*

* P<0.05 by ANOVA and Scheffé test

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 암세포주

Murine melanoma B16 세포주를 10% D-FBS[Fetal Bovine Serum(M.A. Bioproducts, Walkersville, MD)]와 streptomycin, penicillin이 각각 100µg/ml, 100units/ml씩 함유된 RPMI 1640[Roswell Park Memorial Institute(Gibco, Grand Island, N.Y.)]배양액을 사용하여 온도 37℃, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂배양기에서 배양하였다. B16 세포주를 96 well plate에 2.5×10⁴ cells/ml 되도록 분주하였다.

(2) 방사선조사

실온에서 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8 (Atomic Energy Canada Ltd, Ottawa, Ontario, Canada)을 이용하여 선량을 210 cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10Gy를 단회조사하였으며 SSD는 60Cm, 조사야는 15×20 cm이었다.

(3) 항암제

Bleomycin sulfate[Nippon Kayaku Co.], cisplatin[Bristol-Myers, S.A.E.]을 0.15M NaCl 용액과 혼합하여 사용하고 실험기간중에는 -70℃ 냉암소에 보관하였다. 실험에 사용한 약제의 농도는 2µg/ml를 중심으로 0.2 µg/ml, 20µg/ml로 구분하여 MTT분석에 적용하였다.

2. 실험방법

방사선조사 후 각각 0.2, 2, 20µg/ml 농도의 bleomycin, cisplatin이 함유된 배양액에 B16 세포를 넣어 현탁액을 만들고 온도 37℃, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂ 배양기에 1시간 보관한 후 동일한 방법으로 2회 원침하여 항암제를 세척하였다. 96 well plates에 RPMI배양액 2ml를 혼합하고 약제의 농도를 구별하여 상기 조건하의 배양기에서 암세포주를 4일간 배양한 후 실험에 적절한 세포주의 증식을 확인하였다. 세포주는 흡광도측정 4시간 전에 MTT 5mg/ml가 혼합된 배양액을 각 well당 200µl씩 넣어 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 100µl/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 세포독성의 백분율을 구하고 대조군과 비교하였으며, 모든 실험은 3회 반복하였다.

III. 실험성적

1. 대조군

B16 세포주는 분주 후 시간경과에 따라 침하여 약 2시간 후에는 대부분이 well기저면에 부착하여 성장하였다. MTT분석에서 방사선조사군의 B16세포주의 최적밀도(optimal density)는 1.04±0.05(2.5×10⁴cells/ml)이었다(Table 1). 한편 bleomycin, cisplatin 단독투여 후 4일째 B16 세포주의 최적밀도는 1.01±0.04(2.5×10⁴cells/ml)이었다(Table 2).

2. 실험군

(1) 방사선 단독조사군

방사선조사 후 4일째 B16 세포주는 2, 4, 6, 8, 10Gy 전 선량에서 방사선량이 증가함에 따라 세

Table 2. Effect of Antitumor Drugs on B16 in MTT assay

Drug \ Conc.	0.2	2*	20
Control	1.01±0.04	1.01±0.04	1.01±0.04
Bleomycin	0.83±0.03*	0.66±0.03**	0.55±0.06**
Cisplatin	1.02±0.02	0.94±0.07	0.57±0.01**

The values are Mean±S.D.

* Peak Plasma Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)

* $P<0.05$ by ANOVA and Scheffé test

** $P<0.01$ by t-test

Table 3. Effect of Radiation and Bleomycin on B16 in MTT assay

Dose \ Conc.	Control	0.2	2*	20
2Gy	0.97±0.06	0.70±0.05**	0.67±0.05**	0.53±0.03**
4Gy	0.82±0.07	0.77±0.01	0.73±0.02	0.71±0.03*
6Gy	0.81±0.05	0.76±0.02	0.69±0.05*	0.68±0.04
8Gy	0.81±0.07	0.77±0.05	0.70±0.03	0.67±0.01*
10Gy	0.70±0.03	0.57±0.01*	0.53±0.03**	0.49±0.02**

The values are Mean±S.D.

* Peak Plasma Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)

* $P<0.05$ by ANOVA and Scheffé test

** $P<0.01$ by t-test

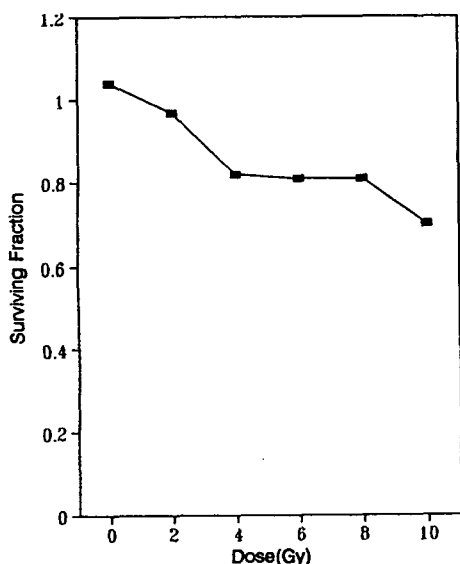


Fig. 1. Radiation Surviving Fraction of B16 in MTT assay

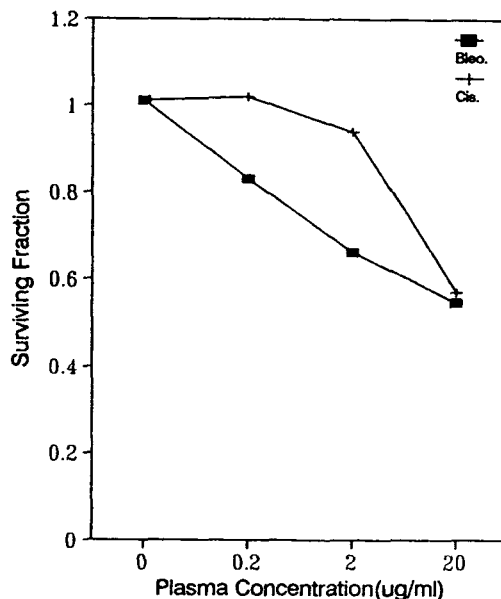


Fig. 2. Effect of Antitumor Drugs on B16 in MTT assay

Table 4. Effect of Radiation and Cisplatin on B16 in MTT assay

Dose \ Conc.	Control	0.2	2*	20
2Gy	0.97±0.06	0.76±0.02*	0.74±0.09*	0.56±0.06**
4Gy	0.82±0.07	0.80±0.03	0.77±0.01	0.70±0.03*
6Gy	0.81±0.05	0.74±0.10	0.65±0.05	0.60±0.10*
8Gy	0.81±0.07	0.70±0.00	0.65±0.02**	0.58±0.02**
10Gy	0.70±0.03	0.58±0.01	0.53±0.11	0.50±0.02*

The values are Mean±S.D.

* Peak Plasma Concentration($\mu\text{g/ml}$)

* $P<0.05$ by ANOVA and Scheffé test

** $P<0.01$ by t-test

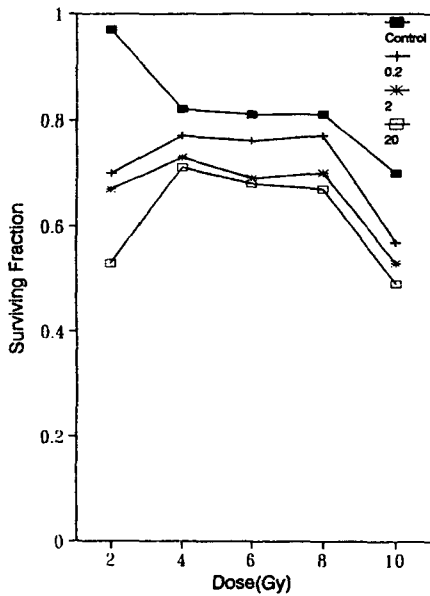


Fig. 3. Effect of Radiation and Bleomycin on B16 in MTT assay

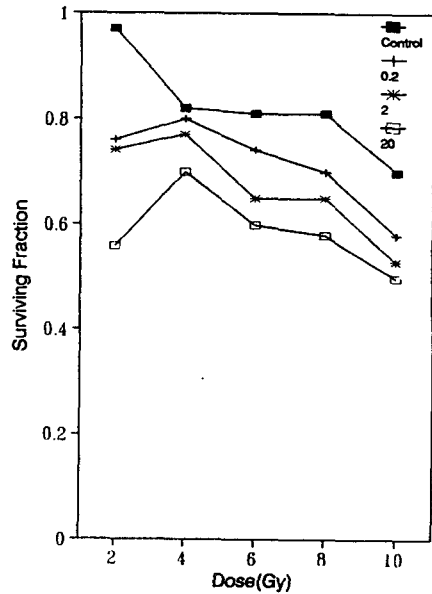


Fig. 4. Effect of Radiation and Cisplatin on B16 in MTT assay

포생존율이 감소되었으며(Table 1), 완만한 기울기의 생존곡선을 나타내었다(Fig. 1). 또한 4, 6, 8, 10Gy에서 대조군과 유의한 세포생존율의 차이를 보였다($P<0.05$).

(2) 항암제 단독투여군

B16 세포주에 bleomycin 또는 cisplatin을 단독 투여한 경우 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 bleomycin이 cisplatin보다 세포독성효과가 더 컸으나 ($P<0.05$), 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 유의한 세포생존

율의 차이를 나타내지 않았다(Table 2, Fig. 2).

(3) 방사선조사 후 항암제투여군

B16 세포주에 방사선조사 후 bleomycin을 투여한 경우에는 2Gy와 10Gy에서 대부분 세포생존율의 차이를 크게 나타내었다(Table 3, Fig. 3, $P<0.01$). B16 세포주에 방사선조사 후 cisplatin을 투여한 경우에는 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 방사선조사군 전 선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 보였다(Table 4, Fig. 4, $P<0.05$).

IV. 총괄 및 고안

일반적으로 세포의 방사선감수성은 Bergonié와 Tribondeau 법칙에 의하여 설명될 수 있다. 그러나 이는 생물의 종류에 따라서 또는 동일개체에서도 세포의 증식과 분화정도 뿐 아니라 연령, 조직의 종류, 방사선조사시 세포주기내 시기 등의 생물학적 인자, 조사방사선의 선량, 선질, 선량분포, 선량을 등의 물리적 인자, 그리고 조직의 산소분압과 같은 환경인자에 의하여 영향을 받는다. 또한 방사선의 조사선량은 조사대상의 방사선감수성, 체적 및 시간적 요소에 의존된다. 특히 두경부암은 선량의 증가에 의하여 국소제어율이 높아지며 동일한 선량을 조사하는 경우에는 총 조사선량을 분할조사함으로써 정상조직은 방사선 손상으로부터의 회복을 증가시키면서 암세포의 파괴를 증가시킬 수 있다²⁸⁾.

방사선을 조사받은 세포는 세포분열지연이 일어나며 이때 방사선량이 증가될수록 세포분열 감소로부터 회복까지의 시간이 길어져 분열지연이 증가되고 DNA 합성량도 감소되며 G₂기의 세포들이 축적된다. 분할조사시에는 분할조사간격 내에서 일어나는 세포의 준치사손상으로부터의 회복은 정상조직에서 더 현저하고, 세포분열과정에서의 재분포, 재군집화와 암조직에서의 저산소화에 의해 방사선치료효과를 증가시켜준다²⁹⁾. 방사선조사 후 상당한 시간이 경과된 후 세포는 분열사에 의하여 손상이 일어나고 군집으로부터 이탈된다. 따라서 방사선에 의한 세포생존율을 측정하기 위해서는 충분한 시간이 경과되어야 한다. 본 연구에서는 B16 세포주에 대한 적절한 세포수를 결정하기 위하여 예비실험을 시행하였으며 방사선과 항암제에 의한 세포사까지의 충분한 시간을 부여하기 위하여 방사선조사 4일 후 B16 세포주의 생존율을 구하였다. B16 세포주는 전 선량에서 완만한 기울기의 생존곡선을 나타내었으며 4, 6, 8, 10Gy에서 대조군과 유의한 차이를 보였다(Table 1).

Malaise 등(1989)³⁰⁾은 인체 암세포는 정상조직 세포에 비하여 방사선감수성이 훨씬 다양하게 발현되는데 이러한 암세포의 다양성은 유전형질상 서로 다른 이질성을 지닌 세포들로 구성되어

기 때문이라고 하였다. 따라서 암환자 개개인에 따른 방사선감수성 차이뿐만 아니라 동일환자에서 적출된 암조직도 서로 유전형, 표현형이 다르게 나타난다. 이와 같은 차이는 암의 진행상태, 전이 여부, 염색체형, 세포표면의 항원성, 면역성, 시험관내의 세포성장 특성, 바이러스 수용체 유무 그리고 생화학적 성상 등에 의하여 나타날 수 있다.

암세포의 다양성 때문에 임상에서 세포독성효과를 정확히 평가하는데에는 많은 어려움이 있다. 따라서 임상적용을 위한 많은 연구가 이루어져 왔으며 그 결과 세포배양을 통한 세포독성실험결과를 임상에 적용할 수 있게 되었다. 세포배양을 이용한 세포독성을 평가하기 위해서는 방사선조사선량 또는 항암제농도에 따른 세포생존곡선이 이용되고 있다. Puck 등에 의해 세포생존곡선실험이 처음 시도되었으나 임상에 적용되지는 못하였다³¹⁾. 그 후 이의 임상적용에 대한 많은 실험이 이루어졌으며, 그 결과 일반적으로 암세포의 방사선감수성은 임상반응을 나타내는 지표가 될 수 있어 개개 암세포주의 방사선감수성 실험은 방사선치료 후 생존율을 예측하는데 유용한 것으로 보고되었다.

Fertil와 Malaise(1981)¹⁴⁾, Deacon 등(1984)¹⁵⁾은 암세포의 방사선감수성은 방사선치료시 암조직 반응에 중요한 역할을 할 수 있다고 보고하였다. Burnett 등(1992)¹³⁾은 *in vitro* 섬유모세포의 방사선감수성은 방사선치료 후 *in vivo* 정상조직의 급성반응과 밀접한 관련성이 있다고 하였으며, Greara 등(1993)³⁾은 *in vitro* 정상 피부 섬유모세포의 방사선감수성이 방사선치료 후 *in vivo* 정상조직의 만성반응과 관련성이 매우 컸다고 보고하였다. 또한 Wurm 등(1994)⁴⁾은 인체 섬유모세포에 방사선조사 후 회복시간 경과 후 잔존 DNA 손상의 양과 세포의 생존과 관련성이 크다고 하였다. 이것은 설치류 세포주와 인체 림프구를 이용한 잔존 염색체손상의 연구결과 등(De-wey, Grote, Prosser)과 일치된다³²⁾. DNA 손상은 방사선이 주로 세포사, 염색체이상 그리고 발암변이의 주작용에 의한 결과이다.

한편 항암제감수성실험의 결과와 화학요법의 결과를 평가하는 *in vitro*와 *in vivo* 상관관계에

대하여는 다양한 보고가 있다. Griffin은 인체 총 실성종양을 대상으로 subrenal capsule assay를 시행하여 높은 임상적합도를 보고하였다³³⁾.

Schroyens(1990)⁷⁾은 항암제감수성실험과 화학요법의 결과를 평가하는 in vitro와 in vivo 상관관계에 대하여 내성예견에는 높은 상관관계를 보였으나 감수성예견에는 낮은 상관관계를 보였다고 보고하였다.

항암제 투여방법의 선택은 암환자치료의 효율성과 치료에 대한 내성을 결정하는데 중요한 요인이 된다. 특히 cisplatin의 적절한 투여방법의 선택은 방사선의 증강효과 뿐만 아니라 cisplatin의 축적양을 증가시키고 세포독성도 증가시킬 수 있을 것이다. Cisplatin은 방사선감수성을 극대화하기 위해 방사선조사와 동시에 이용되며 특히 방사선조사 직전에 투여했을 때 부가적인 항암효과보다 더 큰 효과를 나타낸다. Théon등(1994)²⁾은 cisplatin을 방사선조사 전 하루에 한번 또는 나누어 투여했을 때 훨씬 그 효과가 증가되었다고 보고하였다.

본 실험에서는 체외반응에 비교적 안정성이 있는 bleomycin과 cisplatin을 방사선조사 직후 투여하였다. 따라서 cisplatin의 방사선 증강효과 또는 부가효과에 대해서는 향후 방사선조사 전후의 비교연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 항암제단독 투여의 경우 B16 세포주에 대하여 bleomycin이 cisplatin보다 0.2, 2 μ g/ml 농도에서 효과적인 반면 20 μ g/ml 고농도에서는 비슷한 효과를 나타내었다. 2Gy 방사선조사 후 bleomycin 또는 cisplatin을 투여한 경우 전 농도에서 대조군과 유의한 세포생존율의 차이를 나타낸 것은 방사선에 의한 세포독성보다는 항암제에 의한 세포독성이 더 컸던 결과로 사료된다.

MTT분석은 살아있는 세포의 미토콘드리아의 호박산탈수소효소에 의하여 용해성 MTT tetrazolium염이 청색의 불용성 formazan으로 환원되는 것을 이용하는 것으로서 formazan은 용해성이 낮아 최근에는 Wilson이 추천한 용해제로 DMSO를 사용하여 용해성을 증가시키고 spectrophotometer로 흡광도를 측정한다. 본 연구에서도 formazan용해제로 DMSO를 사용하였으며 spectrophotometer로 흡광도 측정시 570

nm의 흡광도를 이용하였다. 한편 MTT분석은 세포배양기간이 길어질수록 배지의 증발을 유발할 수 있어 최소한 일주일에 한번 또는 두번의 배지교환이 이루어져야 한다. 그러나 배지 교환 시에는 오염에 의해 tetrazolium의 양이 감소될 수 있고 동시에 세포수의 감소를 유발할 수 있으므로 본 실험기간 중에는 배지교환은 하지 않았다. 또한 MTT분석은 실제 임상에 적용하기에는 많은 제약이 따르므로 모든 환자에 대하여 보다 정확하고 빠르며 경제적인 분석법이 개발되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구는 암세포주에 대한 방사선 단회조사 및 항암제감수성실험으로서, 향후 방사선 분할조사와 항암제에 대한 효과를 동시에 평가하는 실험이 이루어져야 하며, 또한 암환자의 생존율을 크게 높이기 위해서는 방사선 및 항암제에 높은 내성을 가지는 암세포의 특성들이 명확히 규명되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

Murine melanoma B16 세포주에 대한 방사선 및 항암제의 세포독성반응을 알아보기 위하여 실험실에서 배양된 B16 세포주에 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8을 이용하여 선량을 210cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사하였다. 항암제투여군은 방사선조사 직후 0.2, 2, 20 μ g/ml 농도의 bleomycin과 cisplatin이 함유된 RPMI 배양액에 B16 세포주를 넣어 배양기에서 1시간 보관하였다.

방사선조사와 항암제투여 후 4일 째의 세포생존율을 MTT분석으로 구하여 각각의 세포생존곡선을 작성하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. B16 세포주는 전 선량에서 완만한 기울기의 생존곡선을 나타내었으며 4, 6, 8, 10Gy에서 대조군과 유의한 세포생존율의 차이를 보였다($P < 0.05$).
2. B16 세포주에 대한 bleomycin과 cisplatin의 세포독성반응은 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml의 농도에서는 bleomycin이 cisplatin보다 세포독성효과가 더 컸으나($P < 0.05$), 20 μ g/ml의 농도에서는 유의한 세포생존율의 차이를 나타내지 않았다.

3. B16 세포주에 방사선조사 후 bleomycin을 투여한 경우에는 2Gy와 10Gy에서 세포생존율의 차이를 크게 나타내었다($P < 0.01$).
4. B16 세포주에 방사선조사 후 cisplatin을 투여한 경우에는 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 방사선조사군 전 선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 보였다($P < 0.05$).

REFERENCES

1. Jaulerry, C., Rodriguez, J., Brunin, F., Jouve, M., Mosseri, V., Point, D., Pontvert, D., Validire, P., Zafrani, B., Blaszk, B., Asselain, B., Pouillart, P. and Brugere, J. : Induction chemotherapy in advanced head and neck tumors : results of two randomized trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 23:483-489, 1992.
2. Théon, A., Madewell, B. R., Ryu, J. and Castro, J. : Concurrent irradiation and intratumoral chemotherapy with cisplatin: A pilot study in dogs with spontaneous tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 29:1027-1034, 1994.
3. Geara, F. B., Peters, L. J., Ang, K. K., Wike, J. L. and Brock, W. A. : Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 27:1173-1179, 1993.
4. Wurm, R., Burnet, N. G., Duggal, N., Yarnold, J. R. and Peacock, J. H. : Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 30:625-633, 1994.
5. Hall, E. J., Marchese, M. J., Astor, M. B. and Morse, T. : Response of cells of human origin, normal and malignant, to acute and low dose rate irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 12:655-659, 1986.
6. 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.
7. 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. *Eur. J. Cancer*, 26:834-838, 1990.
8. 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.
9. Girinsky, T., Lubin, R., Pignon, J. P., Chavaudra, N., Gazeau, J., Dubray, B., Cosset, J. M., Socie, G. and Fertil, B. : 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.*, 25:3-7, 1993.
10. 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.
11. O'Brien, C. J., Coates, A. S., Pertersen-Schaefer, K., Shannon, K., Thompson, J. F., Milton, G. W. and McCarthy, W. H. : Experience with 998 cutaneous melanomas of the head and neck over 30 years. *Am. J. Surg.*, 162:310-314, 1991.
12. Ang, K. et al : Postoperative radiotherapy for cutaneous melanoma of the head and neck region. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 30(4):795-798.
13. Burnet, N. G., Nyman, J., Turesson, I., Wurm, R., Yarnold, J. R. and Peacock, J. H. : Prediction of normal tissue tolerance to radiotherapy from in vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet*, 339: 1570-1571, 1992.
14. Fertil, B. and Malaise, E. P. : Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 7:621-629, 1981.
15. Deacon, J., Peckham, M. J. and Steel, G. G. : The radioresponsiveness of human tumors and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother. Oncol.*, 2:317-323, 1984.
16. 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.
17. Rozenzweig, M., Dodion, P. and Bruntsch, U. : Combination chemotherapy with cisplatin, bleomycin and vincristine(CABO) in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 54:1499-1503, 1984.
18. 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.
19. 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.
 20. Ensley, J. F., Jacobs, J. R. and 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*, 54:811-814, 1984.
 21. Geara, F. B., Perters, L. J., Ang, K. K., Wike, J. L., Sivon, S. S., Guttenverger, R., Callender, D. L., Malaise, E. P. and Brock, W. A. : Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low- dose-rate irradiation. *Cancer Res.*, 52:6348-6352, 1992.
 22. 심우남, 이원영 : 사람종양 세포주에 대한 rHu IFN- α A의 시험관내 및 생체내 항암 효과. *대한면역학회지*, 9:249-257, 1987.
 23. 이경영, 박재갑, 황이숙, 김진복 : 인체 암세포주의 MDR1 유전자 발현도와 항암제 감수성에 대한 연구. *대한암학회지*, 22:37-47, 1990.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Taylor, S. G. et al : Combined simultaneous cisplatin / fluorouracil chemotherapy and split course radiation in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.*, 7(7):846-856, 1989.
 27. 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 blast cells. *Leukemic Research*, 12:823- 831, 1988.
 28. 足立忠 : 放射線醫學, 第7版 pp. 137-157, 醫學書院, 1977.
 29. 고병희, 함창곡, 김정진 : 단일조사와 분할조사시 마우스 공장 소낭세포의 방사선효과에 관한 실험적 연구. *대한치료방사선학회지*, 3:1-8, 1985.
 30. 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.
 31. Puck, T. T., Marcus, P. I. : Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 103:653-666, 1956.
 32. cited from 4
 33. Amour, R. J. and Bedford, J. S. : Dose-rate effects between 0.3 and 30 Gy/h in a normal and a malignant human cell line. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 30:83-90, 1994.
 34. Arlett, C. F. and Harcourt, S. A. : Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res.*, 40:926-932, 1980.
 35. Baker, S. R., Makuch, R. W. and Wolf, G. T. : Preoperative cisplatin and bleomycin therapy in head and neck squamous carcinoma : Prognostic factors for tumor response. *Arch. Otolaryngol.*, 107:683-689, 1981.
 36. Balch, C. M., Soong, S. J., Murad, T. M., Smith, J. W., Maddox, W. A. and Durandt, J. R. : A multifactorial analysis of melanoma: IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases(Stage III). *J. Clin. Oncol.*, 1:126-134, 1983.
 37. Basham, C., Mills, J., Douple, E. B. and Roberts, J. J. : The independent action of radiation and cisplatin on the survival and recovery of human tumor cells in vitro and in vivo. *Int. J. Radiat. Biol.*, 55:807-820, 1989.
 38. Borrancó, S. C., Romsdahl, M. D. and Humphrey, R. M. : The radiation response of human malignant melanoma cells grown in vitro. *Cancer Res.* 31:830, 1971.
 39. Bristow, R. G., Hardly, P. A. and Hill, R. P. : Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse for murine tumor cell lines : Parameters of in vitro radiosensitivity and endogenous cellular glutathione levels. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 18:133-145, 1990.
 40. Brock, W. A., Baker, F. L., Wike, J. L., Sivon, S. L. and Perters, L. J. : Cellular radiosensitivity of primary head and neck squamous cell carcinomas and local tumor control. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 18:1283-1286, 1990.

41. Brunin, F., Rodriquez, F., Jaulerry, J., Jouve, C., Pontvert, M., Point, D., Mosseri, D., Pouillart, V., Asselain, P., Brugere, B. and Bataini, J. : Induction chemotherapy in advanced head and neck cancer. : *Acta Oncol.*, 28:61-65, 1989.
42. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47:936-942, 1987.
43. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of radiosensitivity. *Cancer Research*, 47:943-946, 1987.
44. Cooper, J. S., Karen, F. U., Marks, J. and Silverman, S. : Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 31:1141-1164, 1995.
45. Cox, R. and Masson, W. K. : Radiosensitivity in cultured human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Biol.*, 38:375-576, 1980.
46. Deschavanne, P. J., Devieu, D., Fertil, B. and Malaise, E. P. : Reevaluation of in vitro radiosensitivity of human fibroblasts of genetic different origins. *Int. J. Radiat. Biol.*, 50:279-293, 1986.
47. Eisenberger, M. A., Denfrio, J., Silverman, M. and Lessner, H. E. : Combination chemotherapy with bleomycin and hydroxyurea on the treatment of advanced head and neck cancer. *Cancer Treat. Rep.*, 66:1349-40, 1982.
48. 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.
49. Johns, M. E. and Mills, S. E. : Cloning efficiency a possible prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, 52:1401-1404, 1983.
50. Landuyt, W., Ang, K. K. and Van der Schueren, E. : Combinations of simple doses and fractionated treatments of cis-dichlorodiammineplatinum(II) and irradiation: Effects on mouse lip mucosa. *Br. J. Cancer*, 54:579-586, 1986.
51. Merlano, M., Roso, R. and Sertoli, M. R. : Sequential versus alternating chemotherapy and radiotherapy in stage III-IV squamous cell carcinoma of the head and neck : a phase III study. *J. Clin. Oncol.*, 6:627-632, 1988.
52. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63, 1983.
53. Rofstad, E. K. : Growth and radiosensitivity of malignant melanoma multicellular spheroids initiated directly from surgical specimens of tumors in man. *Br. J. Cancer*, 54:569-578, 1986.
54. 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.
55. Tucker, S. L., Turesson, I. and Thames, H. D. : Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Europ. J. Cancer*, 28:1783-1791, 1992.
56. Von Hoff, D. D., Alberts, D. S., Mattox, D. E. et al. : Combination chemotherapy with cisplatin, bleomycin, and methotrexate in patients with advanced head and neck cancer. *Cancer Clin. Trials*, 4:215-218, 1981.
57. Weaver, A., Flemming, S., Kish, J. et al. : Cisplatin and 5-fluorouracil as induction therapy for advanced head and neck cancer. *Am. J. Surg.*, 144:445-448, 1982.
58. 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.
59. 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.
60. 김민숙, 고광준 : 수종의 암세포주의 저선량 방사선감수성에 관한 실험적 연구. *대한구강악안면방사선학회지*, 24(2):249-261, 1994.

-ABSTRACT-

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE RADIOSENSITIVITY AND CHEMOSENSITIVITY OF B16 CELL LINE

Seung-Mog Na, Kawng-Joon Koh

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

The purpose of this study was to aid in the prediction of tumor cell tolerance to radiotherapy and/or chemotherapy. For this study, cell surviving curves were obtained for murine melanoma B16 cell line using semiautomated MTT assay.

2, 4, 6, 8, 10Gy were irradiated at a dose rate of 210cGy/min using ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8. After irradiation, B16 cell lines (2.5×10^4 cells/ml) were exposed to bleomycin and cisplatin at concentration of 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml and 20 μ g/ml for 1 hour respectively.

The viable cells were determined for each radiation dose and/or each concentration of drug. And they were compared to control values.

The obtained results were as follows :

1. There was significant difference of surviving fraction at 4, 6, 8, 10Gy on B16 cell line ($P < 0.05$).
2. There was significant difference of cytotoxicity between bleomycin and cisplatin at concentration of 0.2 μ g/ml and 2 μ g/ml ($P < 0.05$) on B16 cell line, but there was no significant difference of cytotoxicity at concentration of 20 μ g/ml on B16 cell line.
3. There was significant difference of cytotoxicity of bleomycin after irradiation of 2Gy and 10Gy on B16 cell line ($P < 0.01$).
4. There was significant difference of cytotoxicity of cisplatin at concentration of 20 μ g/ml after irradiation on B16 cell line.