

시험관내 KB세포주의 방사선 및 항암제감수성에 관한 연구

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실

홍성우 · 최은숙 · 고광준

목 차

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

I. 서 론

암환자의 발생은 해마다 증가하고 있으며 우리나라의 경우 사망원인 중 첫번째가 뇌졸중이고 두번째가 암이다.

보건복지부의 보고에 의하면 우리나라에서 연간 약 5만명의 암환자가 발생하는 것으로 추정하고 있다. 이 중 구강암의 발생빈도는 3-5%¹⁾로서 우리나라에서 연간 적어도 약 1,500명의 구강암환자가 새로 발생되고 구강암으로 투병중인 환자도 약 10,000명 이상에 이르는 것으로 추정된다.

구강암은 일반적으로 국소적 침윤이나 경부 림프절전이가 주된 전파경로이고 원격전이가

비교적 적어 이의 치료시에는 외과적수술 또는 방사선치료와 같은 국소요법 (local modality)이 주된 역할을 하여왔다²⁾. 또한 국소 치료 후 재발환자나 초진시 원격전이가 있는 환자에게는 항암화학요법이 전신요법(systemic modality)으로 이용되기 시작하였다. 그 후 항암제를 복합적으로 사용할 때 항암효과가 항진됨이 보고되면서 복합화학요법(combination chemotherapy)이 시도되었다^{3,4)}.

구강암치료시 림프절을 침범하지 않은 T1과 T2의 초기암은 방사선치료 또는 외과적수술 단독치료로서도 국소제어율을 현저히 증가시킬 수 있게 되었으나 T3와 T4의 진행암은 외과적수술 또는 방사선치료와 함께 항암화학요법의 병용요법(combined modality)에 의한 치료에도 암환자의 5년생존율은 만족스럽지 못한 실정이다⁵⁻⁸⁾. 더구나 초진시 및 치료 후 경부 림프절전이가 의심되는 경우에는 의심되지 않은 경우에 비해 암환자의 5년생존율은 반으로 감소된다⁹⁾.

방사선치료 또는 항암화학요법을 이용하는 경우에는 암조직의 방사선감수성 또는 항암제 감수성이 암환자치료의 성패를 좌우하는 중요한 요인이 된다¹⁰⁾. 암조직의 방사선감수성은 그것이 유래하는 정상조직의 방사선감수성에 의존되는데¹¹⁾, 일반적으로 암세포의 방사선감수성은 그것이 유래하는 정상조직의 방사선감

*이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

접수일:1998년 1월 14일
채택일:1998년 1월 26일

수성보다 높아 방사선치료가 가능하다.

구강암은 구강점막상피, 치아관련조직, 결합조직, 골조직, 타액선조직, 림프조직 등으로부터 유래되어 발생되며, 구강점막상피로부터 유래되는 편평세포암종은 중등도 이상의 방사선감수성을 보이고 림프조직으로부터 발생하는 악성림프종 또는 정상피종등은 높은 방사선감수성을 나타낸다. 반면 타액선조직으로부터 유래되는 선암종, 점막유표피종양 등은 중등도보다 약간 낮은 방사선감수성을 보이며 결합조직으로부터 발생하는 골육종, 근육종 등은 낮은 방사선감수성을 나타내어 60Gy/6주의 방사선량으로서 암조직의 국소제어가 어렵다. 일반적으로 구강암은 80% 이상이 편평세포암종으로 방사선감수성면에서 볼 때 일부 방사선감수성이 낮은 종양을 제외하고 방사선치료가 가능하다고 할 수 있다.

암세포의 방사선감수성은 방사선치료의 반응을 나타내는 지표가 될 수 있어 이에 대한 실험결과는 방사선치료 후의 국소제어를 예측하는데 이용될 수 있다¹²⁾. 또한 항암화학요법을 시행하는 경우에는 항암제감수성이 높은 항암제를 선택함으로써 암치료효과를 높일 수 있다.

한편 항암제에 의한 암환자의 치료효과를 향상시키고 부작용을 감소시키기 위해서는 항암제의 작용기전을 명확히 규명하는 것이 중요하다. 항암화학요법에 이용되는 항암제의 종류에는 작용기전에 따라 항암성항생물질군, 알킬화제군, 대사길항제군, 스테로이드호르몬군, 유사분열억제제군, 기타군의 여섯군으로 대별된다.

1980년대 초 구강암치료에 cisplatin의 효과가 보고되면서 항암화학요법의 역할이 더욱 증대되었다. cisplatin은 작용기전에 따라 알킬화제군으로 분류되며, bleomycin은 항암성항생물질군으로 분류된다. 또한 항암화학요법을 시행하는 경우에는 항암제를 단독투여하는 것보다 복합투여함으로써 항암효과가 항진됨이 보고되면서 복합화학요법이 시도되었다¹³⁾. 복합화학요법에는 cisplatin을 주체로 한 5-FU(flourouracil), bleomycin(peplomycin), methotrexate 등의 항암제가 이용되고 있다. 그러나 아직 구

강암에 대한 복합화학요법 단독치료로는 완전관해(complete response)에 이르지 못하고 있는 실정이다. 따라서 구강암치료시에는 항암화학요법과 외과적수술 또는 방사선치료와의 병용요법에 의한 치료가 많이 이용되고 있다. 즉 외과적수술 후 보조화학요법(adjunct chemotherapy) 또는 외과적수술이나 방사선치료전에 먼저 항암화학요법을 시행하는 유도화학요법(induction chemotherapy)이 시행되고 있다.

방사선감수성에 관한 연구로는 인체의 정상세포에 대한 연구¹⁴⁻¹⁸⁾, 인체의 정상세포와 암세포주에 대한 연구¹⁹⁾, 그리고 인체 암조직으로부터 분리시킨 암세포주에 대한 연구^{7, 20-22)} 등이 활발하게 진행되어왔다. 1956년 Puck와 Marcus²³⁾가 HeLa세포를 대상으로 방사선조사에 의한 세포생존곡선이 작성된 이래 방사선감수성 연구에 이 생존곡선이 이용되고 있다. Fertil과 Malaise²⁴⁾는 세포주에 방사선조사 후 2Gy 방사선량에서의 세포생존율이 세포주의 방사선감수성을 결정하는데 중요한 척도가 된다고 보고하였다. 또한 清水谷⁷⁾는 인체 구강저암 KB세포주에 방사선을 조사한 후 얻은 세포생존곡선에서 2Gy의 방사선량에서 세포생존곡선의 기울기가 작아 방사선감수성이 비교적 낮다고 하였다. 또한 고등²⁵⁾은 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 대하여 보고한 바 있다.

항암제감수성에 관한 연구로는 Drewinko등²⁶⁾, Carmichael등²⁷⁾, Schroyens등²⁸⁾, Takahara²⁹⁾, Nio등³⁰⁾, Fujisaki등³¹⁾의 보고가 있다. Ensley등³²⁾, Taylor등³³⁾, Chang등³⁴⁾, Pekkola등³⁵⁾은 두경부 편평세포암종에 대한 항암화학요법과 방사선치료의 항암효과, Carmichael과 Hickson¹⁰⁾은 항암제와 방사선의 세포내성의 작용기전에 대하여 보고한 바 있으며, Rooney등³⁾은 중증의 두경부 악성종양의 치료에 cisplatin과 5-FU의 복합화학요법의 효과를 보고하였다. 또한 Jaulerry등³⁶⁾은 두경부암에 대한 유도화학요법의 효과, 清水谷⁷⁾는 인체 구강저암 KB세포주에 대한 방사선과 항암화학요법의 병용효과에 대하여 보고한 바 있다. 한편 국내에서 최와 고³⁷⁾는 YAC-1세포주의 방사선 및 항암제에

관한 연구, 심과 이³⁹⁾는 인체 종양세포주에 대한 인터페론의 시험관내 및 생체내 항암효과, 이등³⁹⁾은 인체 암세포주의 MDR1 유전자발현도와 항암제감수성 그리고 이등⁴⁰⁾은 시험관내 및 생체내 암세포의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성에 대하여 보고한 바 있다.

암세포주에 대한 세포독성을 검사하는 방법으로는 시험관내 또는 생체내 검색법이 있으며 시험관내 검색법으로는 dye exclusion 분석법(DEA)⁴¹⁾, human tumor clonogenic 분석법(HTCA)⁴²⁾, scintillation 분석법⁴³⁾, sulforhodamine B(SRB) 분석법⁴⁴⁾, bincinonic acid(BCA) 분석법⁴⁵⁾, MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석법⁴⁶⁻⁴⁸⁾ 등이 이용되고 있다. 이 중 MTT 분석법은 정량적으로 단기간의 세포독성반응을 평가하는데 유용하며 실험결과의 객관성 및 재현성이 우수하므로 초기검색이나 대량검색에 우수한 검색법으로 알려져 있다.

지금까지 암세포주에 대한 방사선감수성 또는 항암제감수성에 대한 연구는 활발하게 진행되고 있으나 이들의 병용효과에 대한 연구는 드문 실정이다.

본 연구는 인체 구강저암 KB세포주에 대한 방사선 단독조사, 항암제 단독투여 그리고 방사선조사 직후 항암제투여를 병용한 후 세포독성반응을 평가한 것으로서 향후 두경부암 환자의 치료시 치료반응을 예측할 수 있는 기초자료를 얻는데에 그 목적이 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 암세포주

사람 구강저 편평세포암종 KB세포주를 10% D-FBS[Fetal Bovine Serum(M.A. Bioproducts, Walkersville, MD)]와 streptomycin, penicillin이 각각 100 μ g/ml씩 함유된 RPMI 1640[Roswell Park Memorial Institute(Gibco, Grand Island, N.Y.)]배양액을 사용하여 온도 37°C, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂배양기에

서 배양하였다. KB세포주를 96 well plate에 3 × 10⁴ cells/ml되도록 분주하였다.

(2) 방사선조사

실온에서 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8 (Atomic Energy Canada Ltd, Ottawa, Ontario, Canada)을 이용하였다.

(3) 항암제

bleomycin sulfate [Nippon Kayaku Co.], cisplatin[Bristol-Myers, S.A.E.]을 0.15M NaCl 용액과 혼합하여 사용하였고, 실험기간 중에는 -70°C 냉암소에 보관하였다. 실험에 사용한 약제의 농도는 2 μ g/ml이었다.

2. 실험방법

(1) 방사선 단독조사

KB세포주에 ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8을 이용하여 선량을 210cGy/min로 2, 4, 6, 8, 10Gy를 단회조사하였으며, SSD는 60cm, 조사야는 15 × 20cm²이었다.

(2) 항암제 단독투여

KB세포주에 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여하였다.

(3) 방사선조사 후 항암제투여

방사선조사 직후 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin이 함유된 배양액에 KB세포를 넣어 현탁액을 만들고 온도 37°C, 습도 95%가 유지되는 5% CO₂배양기에 1시간 정치한 후, 동일한 방법으로 2회 원침하여 항암제를 세척하였다. 96 well plate에 RPMI 배양액 2ml를 혼합하고 상기 조건으로 배양기에서 암세포주를 3일간 배양한 후 실험에 적절한 세포주의 증식을 확인하였다.

(4) MTT 측정

KB세포주는 흡광도 측정 4시간 전에 MTT 5mg/ml가 혼합된 배양액을 각 well당 200 μ l씩 넣어 4시간 배양하였다. 배양액을 버리고 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 100 μ l/well씩 넣

어 15분간 실온에 정치한 후 세포내 형성된 MTT formazan product를 용해하여 분광광도계 540nm에서 용해된 MTT의 흡광도를 scanning multiwell spectrophotometer (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay Reader : Biotek Instruments, Inc. Burlington, VT)로 측정하여 세포독성의 백분율을 구하고 모든 실험은 3선 반복하였다.

III. 실험 성적

1. 대조군

KB세포주는 분주 후 배양액 내에서 부유되어 성장하였다. MTT분석에서 방사선 단독조사군 또는 항암제 단독투여군의 4일째 KB세포주의 최적밀도는 $0.80 \pm 0.12 (3 \times 10^4 \text{ cells/ml})$ 이었다(Table 1, 2).

2. 실험군

(1) 방사선 단독조사군

방사선조사 후 4일째 KB세포주는 2, 4, 6, 8, 10Gy의 각 조사군에서 세포생존율을 백분율로 환산하였을 때 0.75-0.54의 범위를 보였고, 방사선량이 증가됨에 따라 세포생존율이 감소되었으며(Table 1), 비교적 기울기가 큰 세포생존곡선을 나타내었다(Figure 1).

(2) 항암제 단독투여군

KB세포주에 $2\mu\text{g/ml}$ 농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 각각 단독투여한 경우 대조군에 비하여 세포생존율을 환산하였을 때 각각 0.85, 0.63으로 감소되었다($P < 0.05$). bleomycin투여군과 대조군의 세포독성효과의 차이는 없었으나 cisplatin투여군과 대조군의 세포독성효과의 차이는 인정되었다. 또한 bleomycin과 cisplatin의 세포독성효과의 차이도 인정되었다(Table 2, $P < 0.05$).

(3) 방사선조사 후 항암제투여군

KB세포주에 방사선조사와 $2\mu\text{g/ml}$ 농도의 bleomycin투여를 병용한 경우, 방사선 단독조사군과 비교하여 세포생존율은 백분율로 0.70-0.83의 범위를 보였고, 2Gy와 10Gy의 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었다(Table 3, Figure 3, $P < 0.05$). 또한 KB세포주에 방사선조사와 $2\mu\text{g/ml}$ 의 cisplatin투여를 병용한 경우의 세포생존율은 백분율로 0.51-0.75의 범위를 보였고, 방사선을 단독조사한 경우와 비교하여 2, 4, 6, 8, 10Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이가 있었다(Table 3, Figure 4, $P < 0.05$). 그러나 방사선조사와 $2\mu\text{g/ml}$ 의 bleomycin 또는 cisplatin투여를 병용한 경우에 두 군 사이에서는 10Gy의 방사선량에서만 세포생존율의 차이가 인정되었다(Table 3, $P < 0.05$).

Table 1. Radiation Surviving Fraction of KB Cell Line in MTT assay

Dose	Surviving Fraction (Mean \pm S.D.)	Ratio
Control	0.80 ± 0.12	1
2Gy	$0.60 \pm 0.03^*$	0.75
4Gy	$0.53 \pm 0.07^*$	0.66
6Gy	$0.52 \pm 0.07^*$	0.65
8Gy	$0.50 \pm 0.00^*$	0.63
10Gy	$0.43 \pm 0.04^*$	0.54

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

Table 2. Effect of Antitumor Drugs on KB Cell Line in MTT assay

Dose	Surviving Fraction (Mean \pm S.D.)	Ratio
Control	0.80 \pm 0.12	1
Bleomycin	0.68 \pm 0.02*	0.85
Cisplatin	0.50 \pm 0.03*	0.63

* Significantly different by DUNCAN test (P<0.05)

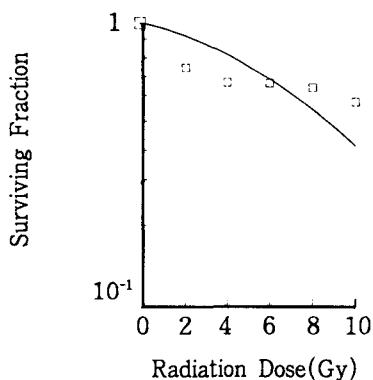


Figure 1. Radiation Surviving Fraction of KB Cell Line in MTT assay

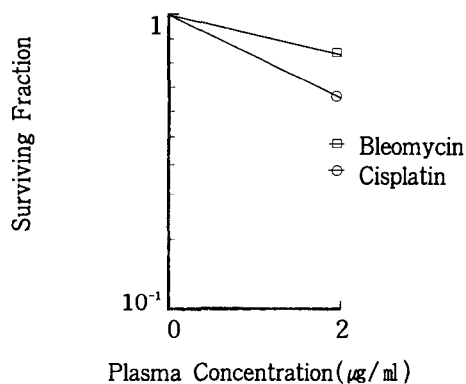


Figure 2. Effect of Antitumor Drugs on KB Cell Line in MTT assay

Table 3. Effect of Radiation and Antitumor Drugs on KB Cell Line in MTT assay

Radiation Dose	Radiation Only	Radiation+ Bleomycin(2 ⁺)	Ratio	Radiation+ Cisplatin(2 ⁺)	Ratio
	Surviving Fraction	Surviving Fraction		Surviving Fraction	
2Gy	0.60 \pm 0.03	0.46 \pm 0.06*	0.77	0.41 \pm 0.03*	0.68
4Gy	0.53 \pm 0.07	0.44 \pm 0.05	0.83	0.40 \pm 0.04 *	0.75
6Gy	0.52 \pm 0.07	0.41 \pm 0.04	0.79	0.37 \pm 0.02 *	0.70
8Gy	0.50 \pm 0.00	0.38 \pm 0.10	0.76	0.27 \pm 0.03 *	0.54
10Gy	0.43 \pm 0.04	0.30 \pm 0.03*	0.70	0.22 \pm 0.01 *	0.51

The Values are Mean \pm S.D.

2+ : Peak Plasma Concentration

* Significantly different by DUNCAN test (P<0.05)

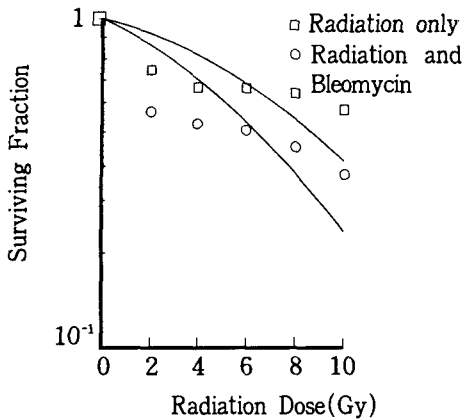


Figure 3. Effects of Radiation and Bleomycin on KB Cell Line in MTT assay

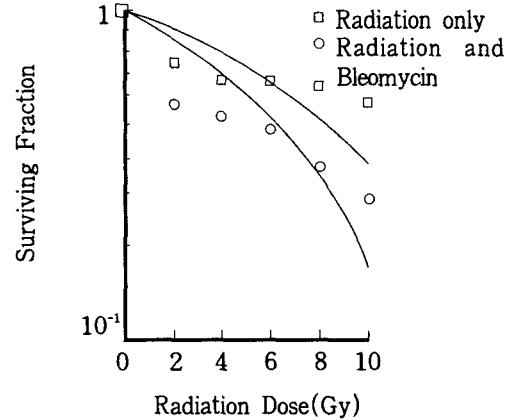


Figure 4. Effects of Radiation and Cisplatin on KB Cell Line in MTT assay

IV. 총괄 및 고안

일반적으로 암세포의 방사선 또는 항암제감수성은 임상반응을 나타내는 지표가 될 수 있어 암세포주의 방사선 또는 항암제감수성실험은 암환자치료 후의 생존율을 예측하는데 이용될 수 있다²⁹⁾. 따라서 암환자에게 방사선치료 또는 항암화학요법을 시행하기 전에 그 치료결과를 예측하고 치료효과를 높이기 위하여 암조직으로부터 암세포를 분리하고 이의 방사선감수성 또는 항암제감수성을 미리 평가하는 실험이 이루어졌다²⁸⁾. 그러나 실제 환자로부터 생검한 조직에서 정상세포를 잘 분리하고 암세포만을 적절한 조건하에서 배양한 후 실험하는 데에는 많은 어려움이 있다. 따라서 계대 배양한 암세포주를 대상으로 실험실에서 적절한 배양조건하에서 방사선감수성 또는 항암제감수성실험이 이루어지게 되었다.

실험실에서 섬유모세포주의 방사선감수성에 대하여 Burnett등⁴⁹⁾은 방사선치료 후 인체 정상조직의 급성반응과 밀접한 관계가 있다고 하였으며, Geara등¹⁴⁾은 방사선치료 후 정상조직의 만성반응과 관련성이 크다고 하였다. Wurm등⁵⁰⁾은 인체 섬유모세포에 방사선조사 후 회복시간 경과 후 잔존 DNA손상(residual

damage)의 양과 세포생존율과는 관련성이 크다고 보고하였다. DNA손상은 방사선의 세포에 대한 주작용으로서 세포사, 염색체 이상, 발암변이 등의 결과이다. 또한 방사선치료시에는 총방사선량을 단회조사하는 것보다 분할조사하는 것이 저선량을 장기간 조사함으로써 정상조직은 방사선손상으로부터 회복을 기대하면서 암세포의 파괴를 증가시킬 수 있다¹⁷⁾. 이와같이 방사선생물학적 관점에서 분할조사시에는 분할조사 간격 내에 일어나는 조직세포의 준치사손상으로부터의 회복이 암조직보다 정상조직에서 현저하고 세포분열과정에서의 재분포, 재군집화 및 중양세포에서 일어나는 재산소화가 방사선효과를 증대시켜준다⁵¹⁾. 한편 항암제감수성 실험결과와 항암화학요법 치료결과에 대한 상관계에 대해서는 다양한 보고가 있다. Bogden등⁵²⁾은 인체 총실성종양을 대상으로 마우스 신피막하이식법(subrenal capsule assay)을 시행하여 항암제의 임상예측적중도를 85%로 보고하였다. 한편 Schroyens²⁸⁾는 항암제감수성실험과 항암화학요법 치료결과에 대한 상관계에 대하여 내성예건에는 높은 상관계를 보였으나 감수성예건에는 낮은 상관계를 보였다고 하였다.

암세포의 방사선 또는 항암제의 세포독성효

과를 평가하기 위하여 세포생존곡선을 이용한 연구가 활발히 진행되어왔다. Peacock⁵⁴⁾, Hall⁵⁵⁾은 세포생존곡선에서 그 기울기가 방사선감수성과 밀접한 관련이 있으며 그 기울기가 클수록 방사선감수성이 높다고 하였다. 따라서 세포생존곡선의 기울기를 평가함으로써 암환자의 치료결과를 예측해볼 수 있다. Fertile과 Malaise²⁴⁾는 세포생존곡선에서 세포생존율을 평가한 결과 2Gy 방사선량에서의 세포생존율이 세포주에 대한 방사선감수성을 결정한다고 보고하였다. Brock⁵⁶⁾은 두경부 편평세포암환자를 대상으로 방사선치료 전 생검한 조직으로부터 배양한 세포주에 방사선조사 후 2Gy 방사선량에서의 세포생존율과 방사선치료 후 결과와의 상관관계는 0.11-0.91로서 다양하였으나 0.4 이상인 경우는 0.3 이하인 경우보다 재발가능성이 높다고 하였다.

본 연구에서는 KB세포주에 대한 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사한 경우 방사선량이 증가될수록 세포생존율이 감소되었고 모든 방사선량에서 대조군과의 차이가 인정되었다. 또한 세포생존율을 백분율로 환산했을 때 0.75-0.54로서 세포생존곡선의 기울기는 비교적 크게 나타났다. 따라서 KB세포주는 방사선감수성이 중등도 이상의 범위에 속하는 것으로 사료되며 이러한 연구결과는 편평세포암종의 방사선감수성이 다양하지만 중등도보다 약간 높다는 선학들의 연구결과와도 유사하다.

구강암치료시 방사선치료와 항암화학요법의 병용요법에 사용되어온 항암제는 bleomycin, 5-FU등에서 시작되어 현재에는 cisplatin이 주로 사용되고 있다. 또한 항암제투여시 두 가지 이상의 항암제를 투여하는 복합화학요법으로 치료하는 경우에는 cisplatin + 5FU가 주된 역할을 하고 있다. Kish⁵⁸⁾은 이 요법의 장점으로 cisplatin과 5-FU는 각각 단일제로써 30-40%의 환자에서 관해를 유도할 수 있고 이 두 약제는 상승효과가 있다고 하였으며 5-FU를 계속 주입시 bolus투여에 비해 그 골수독성이 약하여 더 많은 양의 약제투여가 가능하므로 보다 높은 항암효과를 얻을 수 있다고 보고한 바 있다. 이외에 사용되는 항암제로는 methotrexate, vinblastine, mitomycin C 등이 있고 이들의

효과에 대해서는 지속적으로 보고되고 있다. bleomycin은 수용성 당펩타이드로서 두경부, 피부, 폐 등의 편평세포암종의 치료에 효과가 높은 것으로 알려져 있다. bleomycin은 암세포에 작용하여 DNA합성을 방해하고 DNA사슬의 절단을 일으키며 세포주기 중 특히 G₂기에 감수성이 높다. 한편 cisplatin은 단독투여시 다른 항암제보다 효과가 더 큰 것으로 알려져 있고 암세포에 작용하여 세포주기 중 DNA합성방해와 DNA사슬 사이에 교차가 형성된다⁵⁹⁾.

1987년 Murthy⁵⁷⁾은 44례의 수술이 불가능한 두경부암환자와 재발암환자에 대하여 cisplatin-5FU를 방사선치료와 병용치료한 결과 1차 국소제어율이 98%, 2년 후에도 87%의 국소제어율을 보고하여 이 치료법이 국소제어율을 현저히 증가시킬 수 있음을 보고하였다. 清水谷⁷⁾은 30Gy의 방사선조사와 90mg의 bleomycin투여의 병용요법에 의해 T1과 T2의 초기암은 높은 치료반응을 나타내고 T3의 진행암에도 높은 치료반응과 국소제어가 가능하다고 보고하였다. Al-Sarraf⁶⁰⁾은 선행항암화학요법에 실패한 두경부암환자에게 방사선치료와 cisplatin투여를 병용하여 좋은 치료결과를 얻었다고 하였다. Smid⁶¹⁾도 bleomycin 및 mitomycin C투여와 방사선치료를 병용한 경우 방사선 단독치료시보다 항암효과가 더 컸다고 하였다.

본 연구에서는 예비실험을 시행하여 KB세포주에 대한 적절한 세포수를 결정하였다. 또한 적절한 항암제농도를 구하기 위하여 0.2, 2, 20 μ g/ml의 항암제농도를 이용하였고 이 중 가장 실험에 적절한 최고혈중농도인 2 μ g/ml의 항암제농도를 본 실험에 이용하였다. KB세포주에 bleomycin을 단독투여한 경우 세포생존율은 감소되었으나 대조군과의 차이는 인정되지 않았다. 반면 cisplatin을 단독투여한 경우와 대조군과의 세포생존율의 차이는 인정되었다. 이는 KB세포주에 항암제를 단독투여시 bleomycin보다 cisplatin의 세포독성효과가 큰 것으로 사료되며 이 결과는 선학들의 연구결과와 일치된다.

또한 KB세포주에 방사선을 단독조사한 경우보다 방사선조사와 bleomycin 또는 cisplatin

을 병용한 경우 세포독성효과가 더 크게 나타났다. 이러한 결과는 항암제의 세포독성효과와 함께 방사선조사 후 일어나는 KB세포의 준치사순상으로부터의 회복이 방해받기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 방사선조사와 bleomycin을 병용한 경우와 방사선조사와 cisplatin을 병용한 경우 세포생존율의 차이는 10Gy의 방사선량에서만 인정되었다. 이러한 연구결과는 방사선 단독조사시보다 항암제를 동시에 투여한 병용치료시의 효과가 더 크다는 선학들의 연구결과와 일치되며 특히 cisplatin을 투여하는 경우에는 방사선조사량을 증가시키므로써 병용효과를 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

항암화학요법을 시행하는 경우에는 방사선 치료 전 또는 후에 시행할 수 있으며 최근에는 항암화학요법을 시행한 후 방사선조사를 병용함으로써 더 높은 치료효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 일반적으로 유도화학요법은 원발성 암의 국소제어율의 증가를 가져올 수 있으며 암조직의 크기를 감소시켜 외과적수술을 용이하게 하고 방사선감수성이 있는 암조직의 선택에도 도움을 줄 수 있다. 또한 진행된 두경부암환자의 30-50%에서 보일 수 있는 미세한 전이에 대해 초기치료를 가능하게 한다²⁾. 그러나 유도화학요법은 정상조직에 대한 손상을 증가시킬 수 있으며 방사선치료 후 나타나는 점막염이나 피부변화를 증가시킬 수 있다. 특히 cisplatin은 방사선조사 전 투여하여 부가효과를 기대할 수 있는 것으로 알려져 있다. Leliveld등³⁰⁾은 방사선조사 전 cisplatin을 한 번 또는 분할투여하였을 때 더 높은 항암효과를 나타내었다고 보고하였다. 한편 항암화학요법의 효과에도 불구하고 많은 부작용이 수반될 수 있다. bleomycin은 투여량의 증가에 의해 폐독성 또는 알러지반응이 나타날 수 있고 cisplatin은 오심, 구토, 청각손상 및 신독성반응이 있을 수 있어 장기간 또는 효과적용량까지의 투여에 어려움이 있다³¹⁾.

일반적으로 방사선치료 또는 항암화학요법의 단독치료보다 이들의 병용요법이 암치료효과를 증가시킬 수 있는 것으로 보고되고 있지만 아직까지 방사선치료의 총조사량, 조사방법

그리고 항암제투여시의 투여량, 시행횟수 등에 있어 다양한 시도가 이루어지고 있는 실정이다. 그러나 개개 암환자에 대한 최선의 치료법을 선택함으로써 외과적수술에 의한 치료 후의 심미적 또는 기능적인 관점에서 향후 치료법의 개발이 요구된다.

본 연구에서는 KB세포주에 방사선조사 직후 체외반응에 비교적 안정성이 있는 bleomycin과 cisplatin을 각각 투여하였다. 따라서 bleomycin과 cisplatin의 방사선증강효과 또는 부가효과를 평가하기 위해서는 향후 방사선조사 전후의 항암제의 세포독성효과를 비교, 평가해야 할 것으로 사료된다.

MTT분석법은 세포독성을 정량적으로 평가할 수 있고 신속하고 재현성이 높은 분석법으로 세포독성평가지 많이 이용되고 있는 분석법이다⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

본 연구에서도 MTT분석법을 이용하였으며 formazan의 용해성을 증가시키기 위해 DMSO를 사용하였고 spectrophotometer로 흡광도 측정시 540nm의 흡광도를 이용하였다. 그러나 MTT분석법은 실제 임상에서 이용하기에는 어려움이 있어 향후 임상에 적용할 수 있는 정확하고 더 신속한 분석법의 개발이 요구된다.

본 연구는 인체 구강저 편평세포암종 KB세포주에 대하여 방사선 단독조사, 항암제 단독투여 그리고 방사선조사 직후 항암제를 투여하고 세포생존율을 평가하였다.

항 후 방사선 단회조사와 분할조사시의 비교연구, 방사선 및 항암제의 세포독성효과를 증가시킬 수 있는 다른 약제들에 대한 연구도 이루어져야 할 것으로 사료된다. 최근 세포생물학, 분자생물학 및 면역학등의 발달에 의해 암이 세포의 유전자적 이상에 기인하는 것으로 밝혀지고 있으며 이는 새로운 개념의 암치료법의 개발을 요구하게 되었다. 따라서 암환자의 생존율을 증가시키기 위해서는 방사선 또는 항암제에 높은 내성을 나타내는 암세포들의 특성이 명확히 규명되어야 하며 외과적수술, 방사선치료, 항암화학요법과 함께 유전자치료, 면역치료 등의 개발이 요구된다.

사람 편평세포암종 KB세포주에 대한 방사선 및 항암제의 세포독성반응을 알아보기 위하여 방사선 단독조사군은 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사하였으며 항암제 단독투여군은 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 단독투여하였다. 또한 방사선조사와 항암제투여를 병용한 경우에는 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 단회조사한 직후 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 투여하였다. 각각의 실험방법에 따른 세포생존율을 구하고 세포생존곡선을 작성한 후 세포독성반응을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. KB세포주에 2, 4, 6, 8, 10Gy의 방사선을 각각 단회조사한 경우 비교적 기울기가 큰 세포생존곡선을 나타내었다.
 2. KB세포주에 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin을 각각 단독투여한 경우 bleomycin 투여군과 대조군과의 세포독성효과의 차이는 없었으나 cisplatin투여군과 대조군과의 세포독성효과의 차이는 인정되었다. 또한 bleomycin과 cisplatin의 세포독성효과의 차이도 인정되었다.
 3. KB세포주에 방사선을 단독조사한 경우와 방사선조사와 2 μ g/ml농도의 bleomycin투여를 병용한 경우 2Gy와 10Gy의 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 보였다.
 4. KB세포주에 방사선을 단독조사한 경우와 방사선조사와 2 μ g/ml농도의 cisplatin투여를 병용한 경우 2, 4, 6, 8, 10Gy의 모든 방사선량에서 유의한 세포생존율의 차이를 나타내었다.
 5. KB세포주에 방사선조사와 2 μ g/ml농도의 bleomycin 또는 cisplatin투여를 병용한 경우 두 군 사이에서는 10Gy의 방사선량에서만 세포생존율의 차이를 보였다.
1. Lee SK et al: Malignant tumors among Koreans-relative frequency study on 19,140 cases during 1978 to 1986. *Journal of Korean Medical Science* 3(1):1-12, 1988.
 2. 방영주, 윤성수, 박근철, 이재훈, 김승택, 김노경 외: 국한성 진행 두경부 악성종양(편평상피암)에 대한 선행화학요법 및 방사선요법의 병용치료 효과. *대한치료방사선학회지* 20(1):82-89, 1988.
 3. Rooney M, Kish J, Jacobs J: Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin. *Cancer* 55:1123-1128, 1985.
 4. Budd GT, Groppa CW: Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Cancer* 51:589-590, 1983.
 5. Koh KJ, Ikeda H, Shimizutani K, Inoue T, Furukawa S, Fuchihata H: A preliminary and clinical study of radiation therapy for tongue carcinoma. *Oral Radiol* 8(1):1-9, 1992.
 6. Glick JH, Marcial V, Richter M, Velez-Garcia E: The adjuvant treatment of inoperable stage III and IV epidermoid carcinoma of the head and neck with platinum and bleomycin infusions prior to definitive radiotherapy. *Cancer* 46:1919-1924, 1980.
 7. 清水谷公成: ヒト口腔癌由來 KB細胞における X線と ヘフレオマイシンの併用効果. *齒放* 25:232-238, 1986.
 8. Fletcher GH: *Textbook of radiotherapy*, Lea and Febiger, 1980, pp.105-175.
 9. Kim JC, Park IK: Comparison of the result of radiation alone and chemoradiation in cervical cancer. *J Korean Soc Ther Radiol* 13(2):191-198, 1995.
 10. Carmichael J, Hickson ID: Keynote address: Mechanisms of cellular resistance to cytotoxic drugs and X-radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20:197-202, 1991.
 11. 足立忠: 放射線學, 第 7版, 醫學書院, 1979, pp.289-292
 12. Weichselbaum RR, Epstein J, Little JB: In vitro cellular radiosensitivity of human malignant tumors. *Europ J Cancer* 12:47-51, 1976.
 13. Rozenzweig M, Donion P, Bruntsch U, Gallmeier W, Clavel M, Gignoux B et al: Combination chemotherapy with cisplatin, methotrexate, bleomycin, and vincristine in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 54:1499-1503, 1984.

14. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA: Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27:1173-1179, 1993.
15. Dittmann K, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP: Bowman-Birk proteinase(BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radiother Oncol* 34:137-143, 1995.
16. Arlett CF, Harcourt SA: Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Research* 40:926-932, 1980.
17. Malaise EP, Deschavanne PJ, Fertil B: The relationship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells. *Int J Radiat Biol* 56(5):597-604, 1989.
18. Peters LJ: Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cell as a predictor of human tumor response. *Radiotherapy and Oncology* 17:177-190, 1990.
19. Hall EJ, Marchese MJ, Astor MB, Morse T: Response of cells of human origin, normal and malignant, to acute and low dose rate irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12:655-659, 1986.
20. Matthews JHL, Meeker BE, Chapman JD: Response of human tumor cell lines in vitro to fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16:133-138, 1989.
21. Stuschke M, Budach V, Stuben G, Streffer C, Sack H: Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines; studies in a three-dimensional model system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32:395-408, 1995.
22. Girinsky T, Lubi R, Pigno JP, Chavaudra N, Gazeau J, Dubray B et al: Predictive value of in vitro radiosensitivity parameters in head and neck cancers and cervical carcinomas: preliminary correlations with local control and overall survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25:3-7, 1993.
23. Puck TT, Marcus PI: Action of X-rays on mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine* 103:653-667, 1956.
24. Fertil B, Malaise EP: Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7:621-629, 1981.
25. 고경환, 하성환, 박찬일: 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구. *대한치료방사선학회지* 11:17-27, 1993.
26. Drewinko B, Patchen M, Yang LY, Barlogie B : Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferation and nonproliferating human tumor cells. *Cancer Research* 41:2328-2333, 1981.
27. Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE: Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer* 57:540-547, 1988.
28. Schroyens W, Tueni E, Dodion P, Bodeckee R, Stoessel F, Klastersky J: Validation of clinical predictive value of in vitro colorimetric chemosensitivity assay in head and neck cancer. *Europ J Cancer* 26:834-838, 1990.
29. Takahara T: Growth chamber assay, a chemosensitivity test to eliminate normal stromal cells. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 96:59-71, 1995.
30. Nio Y, Tamura K, Tsubono M, Kawabata K, Masai Y, Hayashi H, Ishigami SI: Anticancer chemosensitivity changes between the original and recurrent tumors after successful chemotherapy selected according to the sensitivity assay. *Annals of Surgery* 221:89-99, 1995.
31. Fujisaki T, Wada T, Takahashi M, Yamawaki S, Ishii S: In vitro chemosensitivity assay for human osteosarcoma using tumor xenografts. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 313:279-285, 1995.
32. Ensley JF, Jacobs JR, Weaber A: Correlation between response to cisplatin combination chemotherapy and subsequent radiotherapy in previously untreated patients with advanced squamous cell cancers of the head and neck. *Cancer* 54:811-814, 1984.
33. Taylor SG, Murthy AK, Caldarelli DD, Showell JL, Kiel K, Griem KL et al: Combined simultaneous cisplatin/fluorouracil chemotherapy and split course radiation in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 7(7):846-856, 1989.
34. Chang H: Radiosensitization of cis-platinum in the treatment of advanced head and neck squamous cell carcinoma. *J Korean Soc Ther Radiol* 10(1):27-34, 1992.
35. Pekkola HK, Jaakkola M, Kulmala J, Grenman R: Comparison of cellular radiosensitivity between different localizations of head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 121:452-456, 1995.
36. Jaulerry C, Rodriguez J, Brunin F, Jouve M, Mosseri V, Point D et al: Induction chemotherapy in advanced head and neck tumors: results

- of two randomized trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23:483-489, 1992.
37. 최의환, 고광준: YAC-1 세포주의 방사선 및 항암제감수성에 관한 실험적 연구. *치과방사선* 27(1):43-53, 1997.
 38. 심우남, 이원영: 사람종양 세포주에 대한 rHu IFN- α A의 시험관내 및 생체내 항암효과. *대한면역학회지* 9:249-257, 1987.
 39. 이경영, 박재갑, 아디가즈다, 로리 골드스타인, 황이숙, 김진복: 인체암세포주의 MDR1 유전자 발현도와 항암제감수성에 관한 연구. *J of Korean Cancer Association* 22(1):37-47, 1990.
 40. 이창혜, 이봉기, 이원영, 김주덕: 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포 특성. *연세의대논문집* 16(1):180-192, 1983.
 41. Weisenthal LM, Morsden JA, Dill PL, Macaluso CK: A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res* 43:749-757, 1983.
 42. Hamburger AW, Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197:461-463, 1977.
 43. Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y, Morton DL: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res* 42:2159-2164, 1982.
 44. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D et al: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112, 1990.
 45. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Annals Biochem* 150:76-85, 1985.
 46. Campling BG, Pym J, Galbraith PR, Cole SPC: Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemic Research* 12:823-831, 1988.
 47. Sasaki F, Ishimura H, Takada N, Uchino J: Chemosensitivity test for thyroid cancer by in vitro MTT assay. *Gan To Kagaku Ryoho* 22:1771-1781, 1995.
 48. Klumper E, Pieters R, Kaspers GJ, Huisman DR, Loonen AH, Rottier MM et al: In vitro chemosensitivity assessed with the MTT assay in childhood acute non-lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9:1864-1869, 1995.
 49. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH: Prediction of normal tissue tolerance to radiotherapy from in vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339:1750-1751, 1992.
 50. Wurm R, Burnet NG, Duggal N, Yarnold JR, Peacock JH: Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30:625-633, 1994.
 51. 고병희, 함창곡, 김정진: 단일조사와 분할조사시 마우스공장 소낭세포의 방사선효과에 관한 실험적연구. *대한치료방사선학회지* 3:1-8, 1985.
 52. 김문중: 암화학적요법, 서광의학서립 1991, pp.43-48.
 53. Bogden AE, Griffin W, Reich D: Cancer treatment review 11(Suppl A):113-124, 1984 (cited from 52)
 54. Peacock JH, Eady JJ, Edwards S, Holmes A, McMillan TJ, Steel GG: Initial damage or repair as the major determinant of cellular radiosensitivity? *Int J Radiat Biol* 56(5):543-547, 1989.
 55. Brock WA, Baker FL, Wike JL, Sivon SL, Peters LJ: Cellular radiosensitivity of primate head and neck squamous cell carcinoma and local tumor control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18:1283-1286, 1990.
 56. Kish S, Drelichman A, Jacobs J: Cancer treat rep 66:471-474, 1982.(cited from 52)
 57. Murthy AK, Taylor SG, Showel J, Caldrelli DD, Hutchinson JC, Holinger LD et al: Integration of chemotherapy into the combined modality therapy of head and neck squamous cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13:1807-1813, 1987.
 58. Al-Sarraf M, Pajak TF, Macriac VA, Mowry P, Cooper JS, Stetz J et al: Concurrent radiotherapy and chemotherapy with cisplatin in inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 59:259-265, 1987.
 59. Smid L, Lesnicar H, Zakotnik B, Soba E, Budihna M, Furlan L et al: Radiotherapy, combined with simultaneous chemotherapy with mitomycin C and bleomycin for inoperable head and neck cancer-preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32:769-775, 1995.
 60. Lelieveld, P, Scoles MA, Brown JM, Kallman RF: The effect of treatment in fractionated schedules with the combination of X-radiation and six cytostatic drugs on the RIF-1 tumor and normal mouse skin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11:111-121, 1985.
 61. Anna K, Speke M, Richard P: Repopulation kinetics during fractionated irradiation and the relationship to the potential doubling time. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 31:847-856, 1995.
 62. Barton M, Boyages J, Crennan E, Davis S: Radiation therapy for early stage Hodgkin's disease: Australian patients of care. *Int J*

- Radiat Oncol Biol Phys 31:227-236, 1995.
63. Britten RA, Evans AJ, Allalunis-Turner MJ, Pearcey RG: Effect of cisplatin on the clinically relevant radiosensitivity of human cervical carcinoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34:367-374, 1996.
 64. Deacon J, Peckham MJ, Steel GG: The radioresponsiveness of human tumors and the initial slope of the cell survival curve. *Radiation Oncol* 2:317-323, 1984.
 65. Ervin TJ, Clark JR, Weichselbaum RR, Fallon BG, Miller D, Fabian RL et al: An analysis of induction and adjuvant chemotherapy in the multidisciplinary treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 5(1):10-20, 1987.
 66. Hong WK, Shasphay SM: Treatment of previously untreated stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Clin N Am* 13:521-528, 1980.
 67. Monks A, Scudiero D, Skehen P, Robert S, Paull K, Vistica D et al: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83:757-766, 1991.

-ABSTRACT-

A STUDY ON THE RADIOSENSITIVITY AND CHEMOSENSITIVITY OF KB CELL LINE IN VITRO

Sung-Woo Hong, Eun-Suk Choi, Kwang-Joon Koh

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School 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 human squamous cell carcinoma KB cell line after radiation exposure and/or administration of antitumor drugs. 2, 4, 6, 8, 10Gy were irradiated at a dose rate of 210cGy/min using ⁶⁰Co Irradiator ALDORADO 8. After irradiation, KB cell lines(3×10^4 cells/ml) were exposed to 2 μ g/ml of bleomycin or cisplatin for 1 hour. The viable cells were determined by MTT assay for each radiation dose and/or each drug at the 4th day. And they were compared to control values.

The obtained results were as follows :

1. The slope of the surviving curve after irradiation of 2, 4, 6, 8, 10Gy on KB cell line was relatively steep.
2. There was no significant difference between the cytotoxicity of bleomycin compared to control group. But, there was significant difference between the cytotoxicity of cisplatin compared to control group. And the cytotoxicity of cisplatin was greater than that of bleomycin on KB cell line.
3. There were significant differences of surviving fractions after irradiation of 2Gy and 10Gy with 2 μ g/ml of bleomycin compared with the groups of irradiation only on KB cell line.
4. There were significant differences of surviving fractions after irradiation of 2, 4, 6, 8, 10Gy with 2 μ g/ml of cisplatin compared with the groups of irradiation only on KB cell line.
5. There was significant difference of surviving fraction between groups after irradiation of 10Gy with 2 μ g/ml of bleomycin and cisplatin.