

마우스 간암에서 항암제-방사선 복합요법을 이용한 치료 효과 향상

연세대학교 의과대학 방사선종양학교실, 연세암센터

성진실 · 김성희 · 서창욱

목적 : 마우스 간암에서 방사선과 각종 항암제와의 복합요법을 시행하여, 방사선 감수성을 증가시킬 수 있는 약물을 탐색하고자 하였다.

방법 : C3H/HeJ마우스에 마우스 간암인 HCa-1을 이식하고, 평균 직경 8 mm에 이르렀을 때, 방사선 조사(25 Gy), 항암 약물(5-Fu, 150 mg/kg; adriamycin, 8 mg/kg; paclitaxel, 40 mg/kg; gemcitabine, 50 mg/kg), 또는 방사선과 항암 약물의 복합 치료를 시행하였다. 치료에 대한 종양 반응은 종양 성장 지연과 항진 요인으로 분석하였다. 항진 효과를 보인 약물에 대하여 그 기전 연구는 조직 절편에서 apoptotic 수준을 평가하고, 또한 조절물질의 발현을 분석하였다. p53, Bcl-2, Bax, Bcl-XL, Bcl-XS, p21^{WAF1/CIP1}의 발현 분석은 western blotting으로 하였다.

결과 : Gemcitabine 만이 방사선 감수성을 증가시키는 것으로 나타났다(항진요인:1.6). Gemcitabine과 방사선의 복합 치료는 apoptosis 유도에서는 부가적 수준만을 보였다. 조절물질의 발현 양상은 방사선 단독에 비하여 방사선과 gemcitabine의 병용시 p21^{WAF1/CIP1}의 증가가 유의하게 관찰되었다.

결론 : Gemcitabine은 마우스 간암에서 방사선 감수성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이를 조절하는 요소로서 p21^{WAF1/CIP1}이 관여할 것으로 생각 된다.

핵심용어 : 간암, Gemcitabine, 방사선, Apoptosis, p21^{WAF1/CIP1}

서 론

간암에서 가장 효과적인 치료법은 외과적 절제술이지만 근치적 절제술이 가능한 경우는 일부 환자에 제한되고 있다. 따라서 다양한 종류의 비외과적 치료가 발달되어 왔다.⁵⁻⁸⁾ 간암의 치료에서 방사선 치료의 역할은 이제까지 간과되어 왔으며 이는 간의 방사선 허용선량이 종양의 적정 치료선량에도 못 미치는 35 Gy정도이기 때문이다.^{9, 10)} 최근에 여러 연구자들이 고선량 방사선을 전체 간이 아닌 국소 간에 시도하였다.¹¹⁻¹⁷⁾ 그 결과 국소적 방사선 치료가 안전하고도 효과적인 것으로 나타났다. 그러나, 치료 효과의 상승을 위해서 방사선 치료만으로는 불충분한 것으로 생각되고 있다.

종양 치료에서 방사선과 항암 약물의 복합 치료는 두 치료법간의 상승작용을 이용하여 종양 반응을 향상시키기 위해 시행된다.¹⁸⁾ 따라서 방사선과 상호 작용하여 종양반응을

향상시키는 약물을 찾는 것은 임상적으로 매우 중요하다. 현재 간암의 치료에서 사용되고 있는 약물들로서는 5-Fu, adriamycin, cisplatin 등이 가장 보편적이며, 약물 단독의 임상적 효과는 기대에 못 미치고 있다.⁸⁾ 간암에서 이들 약물과 방사선을 병용 치료할 때, 종양 반응에 유리한 상호 작용이 일어나는지에 대해서는 보고된 바가 없다. 간암의 치료에 방사선을 적극적으로 적용하려면 방사선 감수성을 향상시킬 수 있는 약물을 병용해야 최대의 종양반응을 유도 할 수 있을 것이며, 따라서 방사선 감수성을 항진 시키는 약물의 탐색이 중요하다. 이는 궁극적으로 방사선에 의한 세포사를 증진시키는 물질을 의미하며 세포사 조절에 관여하는 각종 조절물질의 조절작용이 관계될 것이다.

본 연구에서는 방사선과 다양한 항암 약물의 복합 치료 효과를 관찰하여 마우스 간암의 방사선 감수성을 항진시키는 약물을 탐색하고자 하였다. 현재 간암의 치료에 사용되고 있는 약물들(5-Fu, adriamycin, cisplatin)과 최근 개발되었으나 간암의 치료에는 아직 적용되고 있지 않은 약물 중에서 microtubule stabilizing agent인 taxol, DNA synthesis inhibitor인 gemcitabine 등이 분석 대상약물로 포함되었다.

본 연구는 2000년도 과학기술부 원자력 중장기 연구개발 연구비(50042-2000)의 지원으로 수행되었음

이 논문은 2000년 6월 30일 접수하여 2000년 10월 14일 채택되었음.

책임 저자: 성진실, 연세대학교 의과대학 방사선종양학과

Tel: 02)361-7361, Fax: 02)312-9033

E-mail: jsseong@yumc.yonsei.ac.kr

대상 및 방법

1. 마우스와 종양

실험 동물은 주령 8~10주되는 C3H/HeJ 웅성 마우스를 사용하였다. 마우스는 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급 및 사육되었고 온도(22℃)와 습도(55%)가 일정하게 유지되는 사육 환경에서 상자 당 5마리씩 사육 하였다. 사용된 마우스 동종 암인 HCa-I은, p53이 자연형인 종양이다.¹⁹⁾ HCa-I은 25 Gy 조사 시 종양 성장 지연도가 0.3일이고,²⁰⁾ 50% 종양 완치 선량(TCD50)은 80 Gy 이상이며²¹⁾ 방사선에 의한 apoptosis의 유도 수준이 낮아¹⁹⁾ 방사선 내성 종양으로 알려져 있다. 종양 세포는 피사가 없는 부분을 기계적으로 부수어 효소 처리 하였고,²²⁾ 계수 된 세포 10⁶개를 마우스 대퇴부에 주사하였다.

2. 방사선 조사 및 약물 치료

실험군은 대조군, 방사선 조사군, 약물 치료군, 방사선과 약물 복합군 등의 4군으로 분류하였다. 미취되지 않은 마우스를 아크릴 틀에 종양을 심은 다리만을 꺼내어 고정시키고 cobalt -60 방사선 조사기(선량율 0.73 Gy/min)를 이용하여 종양을 심은 다리만을 방사선 조사하였다.

항암 약물은 5-fluorouracil (5-Fu, 중외제약), adriamycin (동아 제약), cisplatin (동아제약), paclitaxel (Bristol-Meyer Squibb, 캐나다), gemcitabine (릴리제약) 이다. 약물 희석은 제조회사 추천 방법에 따랐다. 약물 농도는 발표된 논문^{20, 23, 24)}에 따라 5-Fu, 150 mg/kg; adriamycin, 8 mg/kg; cisplatin, 6 mg/kg; paclitaxel, 6 mg/kg; gemcitabine, 50 mg/kg 등 최대 허용치를 근거로 선택하였다. 약물과 방사선 조사와의 시간 간격은 발표된 논문^{20, 23, 24)}에 따라 5Fu, adriamycin, cisplatin은 방사선 조사 15분전이나 4시간 후에, paclitaxel은 방사선조사 9시간 전에, gemcitabine은 방사선 조사 24시간 전에 투여하였다. 모든 약물은 각 농도를 0.02 ml의 부피에 맞추어 복강내 주사하였다.

3. 치료에 대한 종양의 감수성 분석

치료에 대한 종양의 감수성은 종양 성장 지연으로 측정하였다. 종양이 평균 직경 8 mm에 도달하였을 때 각 실험군을 분류하였고 해당되는 치료 후 주 2~3회 caliper로 서로 직각인 종양의 세 직경을 측정하여 종양 성장을 관찰하였다.

치료로 인한 종양 성장 지연의 효과는 종양의 크기가 치료군이 12 mm에 달하는 평균기간에서 대조군이 12 mm에 도달하는 평균기간을 뺀 절대 성장 지연(absolute growth

delay; AGD) 으로 나타내었다. 항진 요인(enhancement factor; EF)은 표준 성장 지연 값을 절대 성장지연 값으로 나눈 값이다. 표준 성장 지연(normalized growth delay; NGD)은 복합 치료군이 12 mm에 도달하는 평균기간에서 약물치료군이 12 mm에 도달하는 평균 기간을 뺀 값이다.

4. Apoptosis 평가

채취한 조직의 일부를 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 μm 절편을 만들어 hematoxylin eosin 염색을 시행하였다. 이미 보고된 apoptosis의 형태학적 특징에 따라 마우스의 조직 표본에서 apoptosis의 수준을 평가하였다.²⁵⁾ Apoptosis의 평가는 400배 광학 현미경하에서 각 종양의 비피사 부분을 무작위로 선택하여 1,500개의 세포 당 apoptosis을 구하였다.

5. 조직 물질의 발현과 Western blotting

채취한 조직은 잘게 부수어 인산 완충액(PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 10 mg/ml PMSF (Sigma, St. Louis, MO), leupeptin (Sigma) 등을 포함하는 완충액으로 처리하였다. 단백질 용액은 5% β-mercaptoethanol을 포함하는 용액에 100℃에서 5분간 처리 하고 polyacrylamide gel 에서 전기영동하였다. 각 lane의 단백질은 BCA단백질 분석용액(Pierce, Rockford, IL)으로 같은 농도로 맞추었다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA)으로 이동시켰다. 이를 3% 탈지유와 0.1% tween-20을 포함하는 PBS (blocking액)에 상온에서 2시간 동안 처리하고 분석하고자 하는 각 유전 물질에 대한 1차 항체로 2시간 동안 처리하였다. 사용한 1차 항체로는 p53 (Ab7, Oncogene Science, Manhasset, NY), Bcl-2 (Ab7, Oncogene Science), Bax (p19, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), Bcl-XL (Santa Cruz Biotechnology Inc), Bcl-XS (Santa Cruz Biotechnology Inc), p21^{WAF1/CIP1} (Santa Cruz Biotechnology Inc), 등으로 생산회사가 추천하는 농도를 사용하였다. 다시 PBS로 세척하고 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 항양 또는 항토끼 항 IgG 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc.)로 1시간 처리한 후 ECL Western blotting Detection system (Amersham, Arlington Heights, IL)을 사용하여 X선 필름상에 나타나는 band의 진한 정도로 유전물질의 발현을 조사하였다. 발현수준의 평가는 densitometry (CSC chemiluminescence detection module, Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 약물 단독 치료의 항암 효과(Fig. 1)

약물 치료에 대한 종양 반응 평가로 종양 성장 지연을 분석하였다. 조사된 약물은 AGD가 0.7일에서 2.4일 사이로서 종양 성장 지연에서 우수한 효과를 보이지 않았다. 2일 이상의 성장지연을 보인 약물은 adriamycin과 cisplatin 이었고, 5-Fu는 0.7일 로서 조사 약물 중에서 최저의 지연 효과를 보였다.

2. 약물에 의한 종양의 방사선 감수성 증가(Table 1)

종양을 가진 마우스를 각 치료군에 따라 치료하였을 때, 약물과 방사선 조사는 각각 단독으로도 항암 효과를 나타내는 하나 그 효과는 높지 않은 것으로 나타났다.

약물에 의한 종양 감수성의 증가 여부를 좀 더 명확히 하기 위하여 각 약물과 방사선 치료의 복합 치료에 대하여 항진요인을 산출하였다. 5-Fu, adriamycin, cisplatin과 방사선치료를 복합하였을 때 항진요인이 0.47에서 0.71로 매우 낮게 나타나서, 단순부가 효과에도 못 미치는 결과를 보였다. 5-Fu

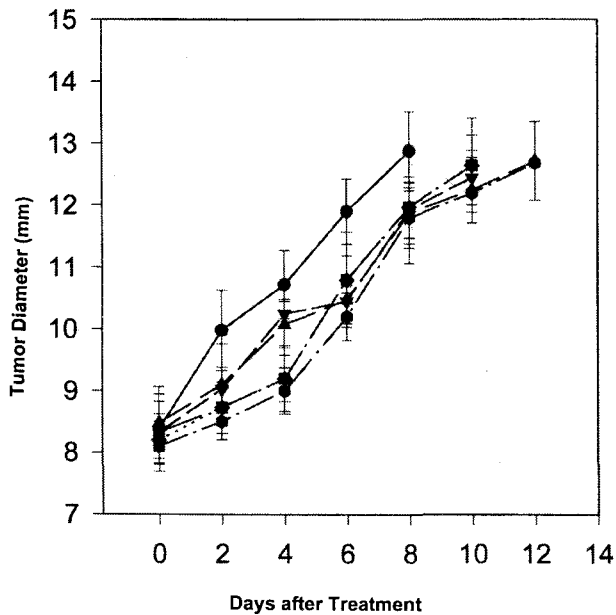


Fig. 1. Antitumor activity of drugs alone in murine hepatocarcinoma, HCa-I. Tumor bearing mice were treated using one of 5 drugs, and tumor growth delay was analyzed. Tested drugs involved 5-fluorouracil 150 mg/kg (■), adriamycin 8 mg/kg (▲), cisplatin 6 mg/kg (▼), each administered 15 min before radiation, paclitaxel 40 mg/kg (◆) was given 9 h before radiation, and gemcitabine 50 mg/kg (●) at 24 h before radiation, compared to the control (●).

경우 방사선 치료 후 약물 치료하는 것이 더욱 효과적이거나 항진요인이 역시 1 이하로 나타났다. paclitaxel은 항진요인이 0.92로서, 단순부가 효과에 상응하는 것으로 나타났다. 항진요인이 1이상인 약물은 유일하게 gemcitabine이었으며, 25 Gy 방

Table 1. Antitumor Efficacy of Radiation, Drugs, or a Combination of Radiation and Drugs in Murine Hepatocarcinoma, HCa-I

Treatment*	Time (d) to grow from 8 to 12 mm	Absolute growth delay†	Normalized growth delay‡	Enhancement factor§
Control	6.6±0.5			
5-Fu	7.3±1.2	0.7		
RT	14.3±1.2	7.7		
5-Fu - RT	12.4±1.4	5.8	5.1	0.66
RT - 5-Fu	10.9±1.5	4.3	3.6	0.47
Control	6.2±0.4			
Adriamycin	8.6±1.1	2.4		
RT	17.4±0.7	11.2		
Adriamycin - RT	16.2±0.8	10	7.6	0.68
RT - Adriamycin	16.5±0.8	10.3	7.9	0.71
Control	6.2±0.5			
Cisplatin	8.3±0.4	2.1		
RT	17.4±0.5	11.2		
Cisplatin - RT	16.1±1.1	9.9	7.8	0.7
RT - Cisplatin	16.3±1.3	10.1	8	0.71
Control	6.2±0.5			
Paclitaxel	8±0.4	1.8		
RT	17.4±0.7	11.2		
Paclitaxel - RT	18.3±0.9	12.1	10.3	0.92
Control	6.2±0.4			
Gemcitabine	7.4±0.3	1.2		
RT	14.7±0.5	7.4		
Gemcitabine - RT	19.1±0.4	12.9	11.7	1.6

* Radiation dose was a single 25 Gy exposure. For the drugs, estimates of the maximum tolerable doses were used: 5-Fu, 150 mg/kg; adriamycin, 8 mg/kg; cisplatin, 6 mg/kg; paclitaxel, 40 mg/kg; and gemcitabine, 50 mg/kg. The time interval chosen with respect to irradiation was based upon the published literature: 5-Fu, adriamycin, and cisplatin were administered 15 min prior to or 4 h after radiation; paclitaxel was administered 9 h prior to radiation; and gemcitabine was administered 24 h prior to radiation. All drugs were administered intraperitoneally as a single dose at a constant volume of 0.02 ml/g of body weight.

† The absolute growth delay (AGD) was defined as the time in days for the tumors to reach 12 mm in treated mice minus the mean time to reach 12 mm in the untreated control group.

‡ The normalized growth delay (NGD) was defined as the time in days for tumors to reach 12 mm in mice treated by the combination treatment, minus the time in days to reach 12 mm in mice treated by drug only.

§ The enhancement factor (EF) was calculated by dividing the NGD by the AGD.

사선 조사 24시간 전에 50 mg/kg의 gemcitabine을 처리하였을 때 항진요인이 1.6으로서 상승 작용이 있는 것으로 나타났다.

3. Gemcitabine과 방사선 조사에 의한 apoptosis 유도 (Fig. 2)

Gemcitabine과 방사선 치료를 복합한 결과가 가장 효과적이었기 때문에 gemcitabine의 방사선감수성 항진효과의 기전을 연구하고자 조직 표본에서 apoptosis 유도 수준을 분석하였다. HCa-I은 방사선에 의한 apoptosis 유도에 내성을 나타내어, 25 Gy 방사선조사 시 최고치는 12시간 후에 2.5%였고 48시간 후에는 대조군 수준으로 회복되었다. Gemcitabine 단독 치료시 28시간 후에 apoptosis 유도 수준이 20.6%로 최대치를 보였으며 32시간 후에도 높은 수준(13.7%)을 유지하였고 36시간 이후부터 4.6%로 떨어졌으며, 마지막 관찰 시간인 72시간에는 5.6%를 유지하였다. 방사선과 gemcitabine복합치료 시 apoptosis의 관찰 시점은 약물 투여 24시간 후부터 진행하였으며 26시간 후에 19.5%로 최고치에 이르렀고 이는 36시간 후까지 유지되었으나(14%), 72시간 후에 8.25%로 감소되었다. 복합 치료시에 유도되는 apoptosis 수준에서 항진 효과는 관찰되지 않았고 단순 부가적인 효과만을 보였다.

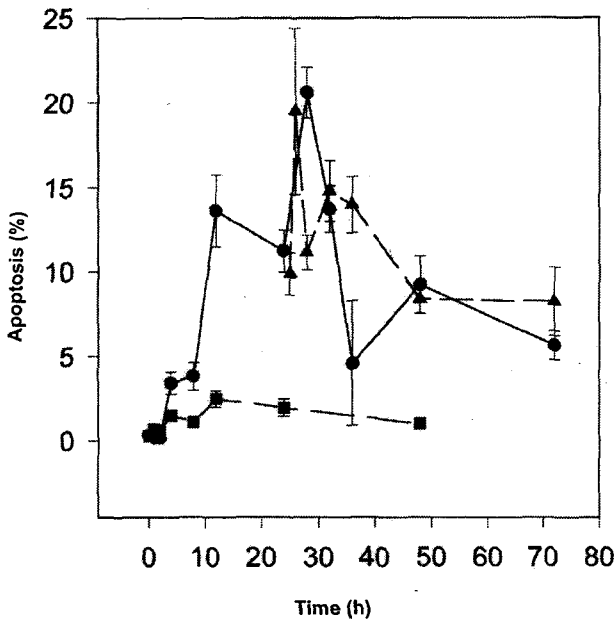


Fig. 2. Induction of apoptosis by gemcitabine 50 mg/kg (●), 25 Gy single dose of radiation (■), and the combination of gemcitabine and radiation (▲), where gemcitabine was given 24 h before radiation. Treatment was given when the tumors reached 8 mm in diameter. Data represent mean±SE.

4. 조절 물질 발현의 변화(Fig. 3)

Gemcitabine에 의한 종양의 방사선 감수성 증가를 설명하기 위해 유전물질의 변화를 분석하였다. p53, p21^{WAF1/CIP1}, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS를 방사선 단독군과 방사선 및 gemcitabine 복합군에 대하여 분석하였다.

25 Gy 방사선 조사 시 p53은 방사선조사 1시간 후부터 증가하였다. 이에 뒤이어 p21과 Bcl-XS가 증가 되었다. Bcl-2나 Bax의 발현 수준의 등락이 현저하지 않았으므로 이 경우 방사선에 의한 apoptosis는 p21이나 Bcl-XS에 의해 조절되는 것으로 생각되었다(Fig. 3A, B).

약물과 방사선을 복합하였을 때, 가장 현저한 변화를 보인 것은 p21으로 나타났다. p21은 1시간부터 증가하여 3배 이상 증가하였다가 2.5배로 약간의 저하를 보이다가 48시간에는 다시 4배로 증가되었다(Fig. 3C, D). Bax을 제외한 Bcl-2 군의 유전 물질들은 2시간에 1.5배로 증가되었다가 감소되었다. p53은 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. Bax는 약간의 저하를 보였다.

고안 및 결론

본 연구에서 마우스 간암인 HCa-I은 방사선과 약물 모두에 대하여 내성을 보였다. 본 연구에서 시험된 5-Fu, adriamycin, cisplatin 등은 실제로 최근 임상에서 사용되고 있는 약물들이며, 제한된 효과가 보고 되고 있다.⁸⁾ Paclitaxel이나 gemcitabine은 최근에 개발된 약물들로서 이들 역시 HCa-I에서 만족할 만한 항암 효과를 보이지 못하였다. 이러한 결과는 항암제나 방사선 단독 치료가 간암 치료에 충분치 못하며, 어떠한 형태로든 복합치료가 필요하다는 것을 시사한다. 본 연구 결과, gemcitabine이 HCa-I의 방사선 감수성을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 약물, 또는 방사선 치료만으로 뚜렷한 항암 효과를 보이지 않았지만 약물과 방사선 복합시에 항진요인이 1.6으로 나타난 것은, 복합 치료시에 두 치료법간에 유의한 상호작용이 있으리라는 것을 암시한다.

Gemcitabine은 DNA 합성 저해 작용을 하는 것으로 알려져 있다.²⁶⁻²⁸⁾ In vitro 연구에서 gemcitabine은 항진요인 1.8로서 방사선 감수성을 증진시키는 것으로 보고되고 있다.²⁹⁻³²⁾ in vivo 연구에서도 nude 마우스에 이식한 인간 상피세포암,³³⁾ 마우스 육종 등에서^{24, 34)} gemcitabine이 방사선 감수성을 증가시키는 것이 확인되었다. 한편 인간 상피세포암은 방사선에 민감한 종양이고 마우스 육종인 SA-NH 도 TCD50이 53.6 Gy

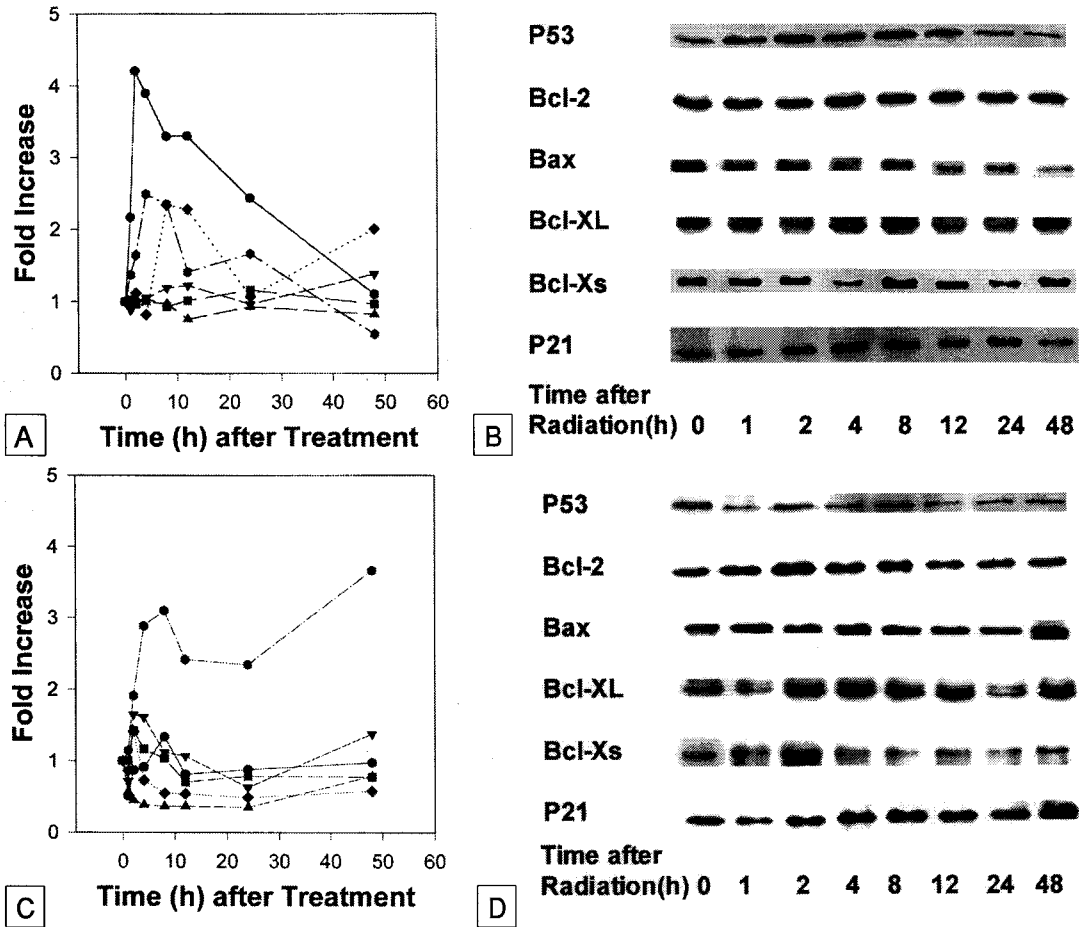


Fig. 3. Comparison of the expression of regulating molecules by radiation alone (25 Gy) (A, B) and in combination with gemcitabine (50 mg/kg) (C, D). When combined, gemcitabine was administered 24 h prior to radiation, the same time schedule as was used to monitor the combined drug and radiation treatment. The results of western blotting analysis (A, C) were analyzed by densitometry and are plotted (B, D) for p53 (●), Bcl-2 (■), Bax (▲), Bcl-XL (▼), Bcl-XS (◆), and p21^{WAF/CIP1} (●)

인 다소 민감한 종양이다.²¹⁾ 반면에 본 연구의 HCa-I은 TCD50이 80 Gy 이상으로서 방사선 내성이 매우 높은 종양이다. 따라서 본 연구 결과는 gemcitabine이 방사선에 내성이 높은 다른 종양에서도 방사선 감수성을 증가 시킬 수 있으리라는 것을 시사하고 있다.

Gemcitabine에 의한 방사선 감수성의 기전은 주로 *in vitro* 세포에서 연구되었다. 인간 대장암 세포주에 10 nmol/L의 gemcitabine을 24시간 노출하거나 100 nml/L 또는 3 mmol/L에 2시간 노출 하였을 때 방사선 감수성의 증가를 보였다.³¹⁾ 이는 deoxynucleotide triphosphate pool이 교란되고 세포주기에서 S기로의 재분포가 적절한 기전으로 제시되고 있다. 마우스 종양 실험에서 Milas 등은 방사선 내성인 S기의 세포가 제거되고 생존한 세포는 방사선에 민감한 세포주기로 재분포되는 것이 gemcitabine에 의한 방사선 감수성이 증가되는 것의

중요한 기전이라고 제시하였으며²⁴⁾ *in vivo*에서 저산소 상태의 종양 세포가 재산소화되는 것도 부수적인 기전으로 제시되고 있다.²⁴⁾

본 연구에서는 gemcitabine과 방사선 복합 시, apoptosis 유도에 있어서 상승작용이 없는 것은 Milas 등²⁴⁾의 결과와 일치한다. 그러나, HCa-I가 어떠한 치료에도 apoptosis가 잘 생기지 않는다는 것을 고려할 때, 복합 치료 시 gemcitabine에 의한 apoptosis 유도는 부가적인 항암 효과를 제공하게 된다.

복합군과 방사선군 간에 조절 물질 발현을 비교 하였을 때 가장 두드러진 변화는 gemcitabine의 추가로 인한 p21^{WAF1/CIP1}의 활성화이다. p21^{WAF1/CIP1}은 방사선 조사 2시간 후 (약물 치료 26시간 후) 증가되어 48시간(약물 치료 72시간 후)까지 높은 수준을 유지하였다(Fig. 3). 실제로 gemcitabine

의 주요 기전 중의 하나가 세포주기 교란이며 p21^{WAF1/CIP1}이 세포주기 조절 물질로 알려져 있기 때문에 본 연구 결과는 이러한 사실과 일치한다. 흥미로운 것은 복합군에서 p21^{WAF1/CIP1}의 증가는 p53의 증가와 일치하지 않았다. 일반적으로 DNA 손상 요인들은 p53을 유도하며, 자연형 p53의 활성화는 그 다음 단계로 p21^{WAF1/CIP1}을 상승시킨다. 본 연구에서 복합군의 p53 증가 수준은 방사선 단독군에 비하여 저조하게 나타났으며, 그럼에도 불구하고 p21^{WAF1/CIP1}가 현저한 증가를 보였다. Tolise 등³⁵⁾과 Rieger 등³⁶⁾은 gemcitabine의 세포독성이 p53 의존적 및 비의존적 기전으로 작용한다고 제시한 바 있다. 본 연구의 복합군에서 p53의 활성화가 낮게 나타났어도 p21^{WAF1/CIP1}가 현저하게 상승되고 이로 인한 결과가 진행된 것은 *in vivo*에서 그들의 결과를 뒷받침한다. Gemcitabine이 p53유도에 의한 p21^{WAF1/CIP1}의 상승을 억제할 가능성도 전혀 배제하기 어려우나, 그보다는 p53의 유도 수준이 낮아도 p53 비의존적 기전으로 p21^{WAF1/CIP1}이 상승하는 것이 주목할 만 하다. 이는 대부분의 악성종양이 p53변이형을 보이기 때문이다. 본 연구 결과는 gemcitabine에 의한 방사선 감수성의 증강 기전에 p21^{WAF1/CIP1}이 관여할 것이라는 것을 시사하고 있다. 이와 관련하여 세포 주기의 분석, cyclin dependent kinase의 활성화 등, 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. p21^{WAF1/CIP1} 이외의 다른 유전자 조절 물질들은 방사선조사군에서와 유사한 결과를 보였다.

Lawrence 등³⁷⁾은 gemcitabine에 의한 방사선 감수성의 증가는 낮은 농도(10 nmol/L)에서의 긴 노출(24시간)과 임상적 허용치 내에서의 높은 농도 (100 nmol/L~3 μM/L)에서의 짧은 노출(2시간)과 연관되어 있다고 하였다. 두 조건이 유도하는 방사선 감수성의 증가는 비슷하지만 두 번째 조건에서는 4시간 이후부터 2일까지의 효과를 보였다. 본 연구의 실험 상태는 두 번째 조건에 가깝다고 볼 수 있으며 p21^{WAF1/CIP1} 증가는 그들의 연구 결과와 일치 하였다.

결론적으로 gemcitabine은 마우스 간암에서 방사선 조사시 항암 효과를 증가시키며, p21^{WAF1/CIP1}이 핵심적인 요소로 생각된다. 이는 간암에서 방사선과 복합치료 하였을 때 치료 효과를 증가시키는 것으로 밝혀진 최초의 약물이다. 그러나 정상 조직에서 방사선 치료와 약물 복합의 효과가 어떠한 지가 임상 적용 전에 먼저 연구되어야 한다. 임상에서 간암의 방사선 치료는 위 및 소장처럼 방사선 허용선량이 낮은 주변 조직의 합병증을 동반하게 된다. Mason 등은 gemcitabine과 방사선 복합 치료시 마우스 소장에서 선량 변경 요인 (dose modifying factor)이 0.96으로서, 오히려 방사선 보호 효과가 약하게나마 나타나는 것을 보고하여 적어도 정상조직

의 손상을 증대시키지는 않는 것을 증명한 바 있다.³⁴⁾ Gemcitabine에 의한 종양의 방사선 감수성의 증가와 동시에 정상조직의 방사선 보호 효과는 gemcitabine과 방사선의 복합 치료를 간암 치료에 적용하는 데에 유용한 토대를 제공할 것이다.

참 고 문 헌

1. Mori W. Cirrhosis and primary cancer of the liver; Comparative study in Tokyo and Cincinnati. *Cancer* 1967;55:627-631
2. Adson MA and Weiland LH. Resection of primary solid hepatic tumors. *Am J Surg* 1981;141:18-21.
3. Inouye AA and Whelan TJ. Primary liver cancer: A review of 205 cases in Hawaii. *Am J Surg* 1979;138:5 3-61
4. Dusheiko GM, Hobbs KE, Dick R, and Burroughs AK. Treatment of small hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1992;340: 285-288
5. Lewis BJ and Friedman MA. Current status of chemotherapy for hepatoma. In: Ogawa M, editor. *Chemotherapy of hepatic tumors*. Princeton, Excerpta Medica: 1984. P.63-74.
6. Venook AP, Stagg RJ, Lewis BJ, Chase JL, Ring EJ, Maroney TP, and Hohn DC. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 1990;8:1108-1114
7. Ikeda K, Kumada H, Saitoh S, Arase Y, and Chayama K. Effect of repeated transcatheter arterial chemoembolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1991;68:2150-2154
8. Venook AP. Treatment of hepatocellular carcinoma: Too many options? *J Clin Oncol* 1994;12:1323-1334.
9. Ingold JA, Reed GB, Kaplan HS, and Bagshaw MA. Radiation hepatitis. *Am J Roentgenol* 1965;93:200-208
10. Wharton JT, Delclos L, and Gallager S. Radiation hepatitis induced by abdominal irradiation with the cobalt 60 moving strip technique. *Am J Roentgenol* 1973;117:73-81
11. Nagashima T. The study of radiotherapy for HCC. *Acta Radiol Jpn* 1989;49:1141-1151
12. Tanaka N, Matsuzaki Y, Chuganzi Y, Osuga T, Kuramoto K, and Tsujii H. Proton irradiation for hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1992;340:1358
13. Robertson JM, Lawrence TS, and Dwarzanin LM. Treatment of hepatobiliary cancers with conformal radiation therapy and regional chemotherapy. *J Clin Oncol* 1993;11:1286-1293
14. Robertson JM, McGinn CJ, Walker S, Marx MV, Kessler ML, Ensminger WD, and Lawrence TS. A phase I trial of hepatic arterial bromodeoxyuridine and conformal radiation therapy for patients with primary hepatobiliary cancers or colorectal liver metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39:1087-1092
15. Seong J, Keum KC, Han KH, Lee DY, Lee JT, Chon CY, Moon YM, Suh CO, and Kim GE. Combined transcatheter arterial chemoembolization and local radiotherapy of

- unresectable hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43:393-397
16. **Seong J, Park HC, Han KH, Lee DY, Lee JT, Chon CY, Moon YM, and Suh CO.** Local radiotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma patients who failed with transcatheter arterial chemoembolization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:1331-1335
 17. **Park HC, Seong J, Lim JH, Kim GE, Han KH, Chon CY, Moon YM, Lee DY, Lee JT, and Suh CO.** Efficacy of local radiotherapy as a salvage modality for hepatocellular carcinoma which is refractory to transcatheter arterial chemoembolization. *J Korean Cancer Assoc* 2000;32:220-228
 18. **Steel GG.** Combination of radiotherapy and chemotherapy. In: Steel GG, editor. *Basic Radiation Biology*. London: Edward Arnold Publishers; 1993. P. 151-162
 19. **Seong J, Hunter N, and L. Milas L.** Induction of apoptosis and expression of apoptosis-related gene products in response to radiation in murine tumors. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 1997;15:187-195.
 20. **Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, and Milas L.** Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1308-1314
 21. **Milas L, Wike J, Hunter NR, Volpe J, and Basic I.** Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: Association with tumor growth parameters and tumor radiocurability. *Cancer Res* 1987;47:1069-1075
 22. **Milas L, Hunter N, Mason K, and Withers HR.** Immunologic resistance to pulmonary metastases in C3H/Bu mice bearing syngeneic fibrosarcoma of different sizes. *Cancer Res* 1974;34:61-71
 23. **Maase H and Overgaard J.** Interaction of radiation and chemotherapeutic drugs in a C3H mouse mammary carcinoma. *Acta Radiol Oncol* 1985;24:181-187
 24. **Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, Milas L, and Meyn RE.** Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res* 1991;127:308-316
 25. **Plunkett W, Gandhi V, Chubb S, Nowak B, Heinemann V, Mineishi S, Sen A, Hertel LW, and Grindey GB.** 2',2'-difluorodeoxycytidine metabolism and mechanism of action in human leukemia cells. *Nucleosides and Nucleotides*. 1989;8:775-785
 26. **Plunkett W, Whang P, Xu Y-Z, Heinemann V, Grunewald R, and Gandhi V.** Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol* 1995;22 (Suppl. 11):3-10
 27. **Plunkett W, Whang P, and Gandhi V.** Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anti-Cancer Drugs* 1995;6(Suppl. 6): 7-13
 28. **McGinn CJ, Shewach DS, and Lawrence TS.** Review: Radiosensitizing nucleosides. *J Natl Cancer Inst* 1996;88: 1193-1203
 29. **Rockwell S and Grindey GB.** Effect of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the viability and radiosensitivity of EMT6 cells in vitro. *Oncol Res* 1992;4:4151-4155
 30. **Shewach DS, Hahn TM, Chang E, Hertel LW, and Lawrence TS.** Metabolism of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1994;54: 3218-3223
 31. **Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, Hertel LW, and Shewach DS.** Radiosensitization of pancreatic cancer cells by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:867-872
 32. **Joschko MA, Webster LK, Groves J, Yuen K, Patatsides M, Ball DL, and Milward MJ.** Enhancement of radiation-induced regrowth delay by gemcitabine in a human tumor xenograft model. *Radiat Oncol Inves* 1997;5:62-71
 33. **Milas L, Fujii T, Hunter N, Elshaikh M, Mason K, Plunkett W, Ang KK, and Hittelman W.** Enhancement of tumor radioresponse in vivo by gemcitabine. *Cancer Res* 1999;59:107-114.
 34. **Mason K, Milas L, Hunter N, Elshaikh M, Buchmiller L, Kishi K, Hittelman W, and Ang KK.** Maximizing therapeutic gain with gemcitabine and fractionated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:1125-1135
 35. **Tolis C, Peters GJ, Ferreira CG, Pinedo HM, and Giaccone G.** Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1999;35:796-807
 36. **Rieger J, Durka S, Streffer J, Dichgans J, and Weller M.** Gemcitabine cytotoxicity of human malignant glioma cells: modulation by antioxidants, BCL-2 and dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 1999;365:301-308
 37. **Lawrence TS, Eisbruch A, and Schwach DS.** Gemcitabine-mediated radiosensitization. *J Clin Oncol* 1997;24(Suppl. 7): 24-28.

Abstract

Enhancement of Tumor Radioresponse by Combined Chemotherapy in Murine Hepatocarcinoma

Jinsil Seong, M.D., Sung Hee Kim, B.S. and Chang Ok Suh, M.D.

Department of Radiation Oncology, Yonsei University Medical College, Yonsei Cancer Center.

Backgrounds : The purpose of this study was to identify drugs that can enhance radioresponse of murine hepatocarcinoma.

Methods : C3H/HeJ mice bearing 8 mm tumors of murine hepatocarcinoma, HCa-I, were treated with 25 Gy radiation and one of the following drugs: 5-Fu, 150 mg/kg; adriamycin, 8 mg/kg; cisplatin, 6 mg/kg; paclitaxel, 40 mg/kg; and gemcitabine, 50 mg/kg. Tumor response to the treatment was determined by tumor growth delay assay and by enhancement factor. Apoptotic level was assessed in tissue sections. Expression of regulating molecules was analyzed by western blotting for p53, Bcl-2, Bax, Bcl-XL, Bcl-XS, and p21^{WAF1/CIP1}.

Results : Among the drugs tested, only gemcitabine enhanced the antitumor effect of radiation, with enhancement factor of 1.6. Induction of apoptosis by a combination of gemcitabine and radiation was shown as only additive level. In analysis of radiation-induced expression of regulating molecules, the most significant change by combining gemcitabine was activation of p21^{WAF1/CIP1}.

Conclusion : Gemcitabine is the first drug showing an enhancement of radioresponse in murine hepatocarcinoma, when combined with radiation. The key element of enhancement is thought to be p21^{WAF1/CIP1}.

Key Words : Hepatocarcinoma, Gemcitabine, Radiation, Apoptosis, p21^{WAF1/CIP1}