

## 동계 마우스 종양의 방사선 감수성 예측인자로서의 생물학적 표지자

포천중문의과대학교 분당차병원 방사선종양학과\*, 연세대학교 의과대학 방사선종양학교실,  
연세암센터, 두뇌한국21 의과학사업단†

장세경\*·† · 성진실† · 김성희† · 신현수\*

**목적:** 방사선 감수성이 다양한 동계(syngeneic) 마우스 종양들을 대상으로 50% 종양억제선량과 종양성장지연 등 방사선 감수성을 대변하는 지표와 방사선에 의해 유도되는 아포토시스 간에 상관관계가 있는지 여부를 알아보고자 하였다. 또한 아포토시스와 관련된 여러 유전물질의 기본(constitutive) 발현수준을 측정 한 후 이들 상호 간의 상관관계를 분석하여 방사선 감수성을 예측할 수 있는 생물학적 표지자를 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법:** 동계 마우스 종양으로는 난소암 OCa-I, 유방암 MCa-K, 편평상피세포암 SCC-VII, 섬유육종 FSa-II, 간암 HCa-I을 사용하였고 이들은 PCR-SSCP 검사상 p53이 모두 자연형인 종양들이었고 주령 8~10 주인 C3H/HeJ 웅성 마우스를 사용하였다. 50% 종양억제선량과 종양성장지연 및 방사선에 의해 유도되는 아포토시스를 측정하여 이들과 방사선에 의해 유도되는 아포토시스간의 상관관계를 분석하여 방사선에 의해 유도되는 아포토시스로 방사선 감수성을 예측할 수 있는지 여부를 알아보고, 또한 아포토시스와 관련된 유전물질 p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, BAX, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub>, p34 등의 기본 발현양상 및 발현수준을 Western blot과 농도계측기로 측정한 후 이들 상호 간의 상관관계를 분석하였다.

**결과:** 방사선에 의해 유도된 아포토시스의 정도와 종양성장지연과의 사이에는 통계적으로 유의한 상관관계가 존재하였다(R=0.922, p=0.026). 50% 종양억제선량과의 사이에는 통계적 유의성은 변연수준이었으나(p=0.070) 상관관계의 경향을 보였다(R=-0.848). p21<sup>WAF1/CIP1</sup>과 p34의 기본 발현수준과 50% 종양억제선량(R=0.893, p=0.041와 R=0.904, p=0.035) 및 종양성장지연(R=-0.922, p=0.026와 R=-0.890, p=0.043) 사이에는 통계적으로 유의한 상관관계가 존재하였다. 즉, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>과 p34의 기본 발현수준이 낮은 경우에 방사선 감수성이 높고, 기본 발현수준이 높은 경우에는 방사선 감수성이 낮은 상관관계가 존재함을 알 수 있었다.

**결론:** 방사선에 의해 유도된 아포토시스의 정도로 종양의 방사선 감수성을 예측하여 볼 수 있을 것으로 생각하며, 종양의 방사선 감수성을 예측할 수 있는 생물학적 표지자로 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>와 p34의 기본 발현수준이 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

**핵심용어:** 방사선 감수성, 마우스 종양, 생물학적 표지자, 아포토시스

### 서 론

방사선치료에서 고려하여야 할 사항 중 가장 중요한 점은 정상조직의 부작용을 최소화하면서 종양의 국소 제어를 최대화 할 수 있도록 방사선량을 조절하는 것이다. 만약 종양의 방사선 감수성을 미리 예측할 수 있다면 조사하

는 방사선량을 조절할 수 있고 방사선에 민감하지 않은 종양이라면 방사선치료 이외의 수술 및 항암화학요법 등의 다른 치료법을 선택하거나 방사선치료 방법을 변형시키는 등의 시도를 할 수도 있을 것이다. 따라서 종양의 방사선에 대한 감수성을 치료 이전에 알아보려는 노력이 다양하게 시도되어 왔다.

과거에는 2 Gy에서의 생존 분획(surviving fraction, SF<sub>2</sub>), 종양 내 산소분압(pO<sub>2</sub>), 잠재배가시간(potential doubling time, Tpot) 등을 측정하여 종양의 방사선에 대한 감수성을 예측하고자 시도되었으나<sup>1~3)</sup> SF<sub>2</sub>의 경우 평판배양효율(plating efficiency)이 어느 정도 이상이 되어야 하고, 기본적으로 결과

이 논문은 2006년 3월 30일 접수하여 2006년 5월 10일 채택되었음.  
책임저자: 성진실, 연세대학교 의과대학 방사선종양학교실  
Tel: 02)2228-8111, Fax: 02)312-9033  
E-mail : jsseong@yumc.yonsei.ac.kr

관독에 4주 이상의 비교적 오랜 시간이 소요되는 단점이 있다. 종양 내 산소분압은 침습적인 방법이라는 점과 종양 내 산소분압이 방사선 감수성을 의미한다기보다는 근본적으로 종양의 악성도 또는 침습성을 나타내는 지표로서 그 의의가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>4,5)</sup> 더욱이 최근에는 SF<sub>2</sub>, 종양 내 산소분압, Tpot 등으로 치료성적을 예측할 수 없다는 내용들이 보고되고 있으므로<sup>4-7)</sup> 효과예측시험(predictive assay)으로는 적절치 못한 방법으로 평가받고 있다.

방사선에 의해 유도되는 아포토시스는 종양에 따라 다양하게 나타나지만 방사선에 민감한 종양에서 아포토시스가 쉽게 유도된다는 연구가 발표되었고<sup>8)</sup> 아포토시스와 방사선의 항암효과 사이에는 상호 연관성이 있다는 보고<sup>9)</sup> 및 아포토시스를 통해 방사선치료 후의 치료성적에 대한 예측이 가능하다는 것이 보고되면서,<sup>10)</sup> 방사선에 의해 유도되는 아포토시스도 50% 종양억제선량(tumor control dose 50, TCD<sub>50</sub>), 종양성장지연(tumor growth delay, TGD) 등과 함께 방사선 감수성을 대변할 수 있는지 여부에 대한 연구들이 진행되고 있다.

최근에는 특정 유전물질이 종양의 내재적인 방사선 감수성과 관계가 깊을 것이라는 가설들과 함께 이에 관련된 연구들이 진행 중이며<sup>11-15)</sup> 이 중 p53에 대한 연구가 가장 많이 수행되어 왔다. 하지만 p53과 항암치료에 대한 저항성에 대해서는 돌연변이형의 p53에 의해 저항성이 증가하거나<sup>16-19)</sup> 감소<sup>18-21)</sup> 혹은 관련이 없는 것으로<sup>22)</sup> 보고되는 등 각각의 실험마다 상이한 연구 결과가 보고되고 있다. 또한 최근에는 p21<sup>waf1/cip1</sup> 등의 p53 이외의 유전물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>23-29)</sup>

하지만 현재까지 수행되어 온 연구의 대부분은 최적의 미세환경이 유지되는 실험실 내에서의 연구이며 생체 내 실험으로 종양의 방사선 감수성을 예측할 수 있는 인자에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 방사선 감수성이 다양한 동계(syngeneic) 마우스 종양들을 대상으로 50% 종양억제선량과 종양성장지연 등 방사선 감수성을 대변하는 지표와 방사선에 의해 유도되는 아포토시스 간에 상관관계가 있는지 여부를 알아보고자 하였다. 또한 아포토시스와 관련된 여러 유전물질의 기본 발현수준을 측정하고 이들 상호 간의 상관관계를 분석하여 방사선 감수성을 예측할 수 있는 생물학적 표지자를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물 및 마우스 종양

실험동물은 주령 8~10주인 C3H/HeJ 웅성 마우스를 사

용하였다. 마우스는 무균상태(specific pathogen free)로 공급 및 사육하였고 온도 22°C, 습도 55%가 일정하게 유지되는 사육환경에서 상자당 5마리씩 사육하였다. 동계 마우스 종양으로는 난소암인 OCa-I, 유방암인 MCa-K, 편평상피세포암인 SCC-VII, 섬유육종인 FSa-II, 간암인 HCa-I을 사용하였고 이들은 PCR-SSCP 검사상 p53이 모두 자연형인 종양들이었다.

### 2. 마우스 종양의 이식과 방사선 조사

마우스 대퇴부에 종양세포들을 이식하여 종양을 성장시켰으며 종양세포의 이식과정은 다음과 같이 하였다. -70°C에 냉동 보관해 온 종양세포를 1차적으로 4~5마리의 마우스 측부 피하에 심어 종양을 성장시켰다. 성장된 종양을 채취하여 피사가 없는 부분만을 선택한 후 기계적으로 부수어 0.025% Trypsin 처리한 후 체로 여과시키고 Sweeney 필터로 통과시켜 단일 부유화된 종양세포만 얻었다. 종양 세포액을 4°C에서 1,500 rpm으로 원심분리한 후 침전물만 얻어 이를 다시 재부유화하였다. 재부유화된 세포액 10 μl에 trypan blue 염색약 990 μl를 섞고 이 중 10 μl만 취하여 100배 현미경하에서 hemocytometer로 활성 세포 수를 계수하였다. 계수된 세포 수를 기준으로 5×10<sup>5</sup>개의 세포를 마우스 대퇴부에 주사하였다. 종양의 성장은 주 2~3 회 caliper로 측정하여 관찰하였으며 서로 직각인 세 직경의 평균치가 8 mm에 도달하였을 때 실험을 시작하였고 실험의 개요는 Fig. 1과 같다.

방사선 조사는 선형가속기(CLINAC 2100C/D, Varian, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 25 Gy를 단일 조사하였다. 마우스를 마취하지 않은 상태로 특수하게 제작된 고정대를 사용하여 종양 부위에만 방사선을 조사하였다.

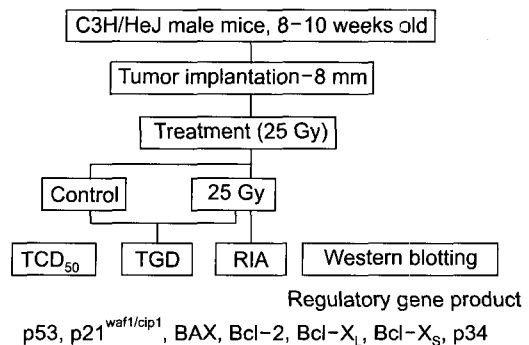


Fig. 1. Flow sheet of experimental design. TCD<sub>50</sub>: Tumor control dose 50, TGD: Tumor growth delay, RIA: Radiation induced apoptosis.

### 3. 50% 종양억제선량과 종양성장지연 측정

50% 종양억제선량은 방사선을 조사 받은 마우스의 50%에서 종양의 완전 관해를 얻는 방사선량으로 정의된다. 이는 종양이 8 mm로 성장한 후 종양 부위에만 방사선을 조사하고 9~12일 간격으로 120일까지 방사선 조사 부위에 종양이 존재하는지를 관찰하여 50%의 마우스에서 종양의 완전 관해를 얻는 방사선량을 구하는 것으로 각각의 방사선량에서 수많은 반복을 시행하여 결정한다.

종양성장지연의 분석은 종양성장지연 기간을 측정하여 치료에 대한 종양의 반응을 평가하는 방법이다. 종양의 평균 직경이 8 mm로 자라면 종양에 대해 방사선치료를 시행하고 2~3일 간격으로 종양의 크기를 지속적으로 측정하고 서로 직각인 세 개의 직경을 측정하여 그 평균으로 크기를 산출하였다. 측정치는 절대성장지연(absolute growth delay)으로 평가하였다. 절대성장지연은 실험군과 대조군 간에 종양이 12 mm 직경에 이르기까지의 기간의 차이이다. 종양의 측정은 방사선 조사 후 종양의 평균 직경이 적어도 15 mm 이상에 도달할 때까지 시행하였다.

### 4. 방사선에 의해 유도된 아포토시스의 측정

방사선치료 후 일정시간 간격으로 마우스를 경추 탈구사시켜 방사선에 의해 유도되는 아포토시스를 측정하였다. 채취한 조직을 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 μm 절편을 만들어 hematoxylin eosin 염색을 시행하고 이미 보인 아포토시스의 형태학적 특징에 따라<sup>30)</sup> 마우스의 조직 표본에서 아포토시스의 수준을 평가하였다. 아포토시스의 평가는 400배 광학현미경하에서 시행하였으며, 1,000개의 세포핵당 apoptotic body 수를 구하였다. 방사선에 의해 유도되는 아포토시스는 방사선조사 후 1~3시간 내에 최대 수준을 보였으며 최대 측정값을 비교 분석하였다.

### 5. Western blotting

종양의 평균 직경이 8 mm로 자라면 조직을 채취하고 Western blotting을 이용하여 아포토시스와 관련된 유전물질인 p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, BAX, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub>, p34 등의 기본 발현수준을 분석하였다. 채취한 조직 약 1 mm<sup>3</sup>를 잘게 부수어 인산 완충액(PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 0.5% NP40, 1 μl/ml dithiothreitol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 10 μl/ml PMSF (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 20 mM Tris-hydrochloride (pH 7.6), 150 mM sodium chloride, 5 mM EDTA 등을 포함하는 냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4°C에서 20분간 원심분리하여

단백질이 용해되어 있는 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 polyacrylamide gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 100 volt로 1시간 동안 전기영동시킨 후 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% tween-20 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 포함하는 PBS (blocking 액)에 2시간 동안 처리하고 분석하고자 하는 각 유전자에 대한 1차 항체로 2시간 동안 처리하였다. 사용한 1차 항체로는 p53 (Ab 7, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Ab 5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), BAX (p-19, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), Bcl-2 (Ab 7, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-x<sub>L</sub> (Ab 1, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-x<sub>s</sub> (Ab 1, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), p34 (Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA) 등으로 생산회사가 추천하는 농도를 사용하였다. 다시 PBS로 세척하고 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 항 IgG 항체로, p53은 항양(antisheep) 항체(Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), p21<sup>WAF1/CIP1</sup>은 항마우스(antimouse) 항체(Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), BAX는 항마우스 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), Bcl-2는 항마우스 항체(Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-x<sub>L</sub>은 항마우스 항체(Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-x<sub>s</sub>는 항마우스 항체(Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), p34는 항마우스 항체(Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA)로 1시간 처리한 후 ECL Western Blotting Detection System (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)을 사용하여 X-선 필름상에 나타나는 band의 농담으로 유전물질의 발현수준을 조사하였다. 발현수준의 평가는 농도계측기(CSC chemiluminescence detection module, Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 분석하였다.

### 6. 통계방법

50% 종양억제선량, 종양성장지연 및 방사선에 의해 유도된 아포토시스와 p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, BAX, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub>, p34 등의 기본 발현수준과의 상관관계는 SPSS 8.0 프로그램의 Pearson 상관 분석을 이용하였다.

## 결 과

### 1. 50% 종양억제선량, 종양성장지연 및 방사선에 의해 유도된 아포토시스

마우스 종양에 따른 50% 종양억제선량은 MD Anderson

Table 1. Tumor Control Dose 50 in Syngeneic Murine Tumors

Tumors	Tumor control dose 50* (Gy)
Oca-I	52.6 (49.3~56.0)
Mca-K	64.7 (63.9~65.6)
Fsa-II	74.8 (68.6~81.6)
SCC-VII	80
Hca-I	≥81

\*values of tumor control dose 50 are quoted from reference 31 and 32, with permission, numbers in parentheses represent 95% confidence limits.

Table 2. Tumor Growth Delay in Syngeneic Murine Tumors

Tumors	Tumor growth delay* (day)
Oca-I	26.9±4.3
Mca-K	15.5±1.6
Fsa-II	10±3.3
SCC-VII	8±3.0
Hca-I	7.4±2.6

\*shown in mean±SE

암센터의 Milas 등<sup>31,32</sup>의 결과를 인용하였고 OCa-I, Mca-K, Fsa-II, SCC-VII, Hca-I에서 각각 52.6 (49.3~56.0) Gy, 64.7 (63.9~65.6) Gy, 74.8 (68.6~81.6) Gy, 80 Gy, 81 Gy 이상으로 OCa-I에서 방사선 감수성이 가장 높았고 Hca-I에서 가장 낮았다(Table 1). 종양성장지연은 동계 마우스 종양에 따라 OCa-I, Mca-K, Fsa-II, SCC-VII, Hca-I에서 각각 26.9±4.3일, 15.5±1.6일, 10±3.3일, 8±3.0일, 7.4±2.6일로 50% 종양억제선량의 결과에서와 같이 OCa-I의 경우가 방사선에 가장 민감하였고 Hca-I의 경우가 방사선에 가장 저항성이 높았다(Table 2). 방사선에 의해 유도된 아포토시스는 OCa-I에서만 16.2±3.3%로 다른 종양에 비해 많이 관찰되었고 Mca-K, Fsa-II, SCC-VII, Hca-I에서는 각각 0.5±0.2%, 1±0.2%, 0.3±0.1%, 0.3±0.1%로 큰 차이가 없었다(Table 3).

## 2. 유전물질의 기본 발현양상 및 발현수준

Western blotting을 이용하여 아포토시스와 관련된 유전물질의 기본 발현양상을 알아보았다. 유전물질의 기본 발현양상은 마우스 종양에 따라 다양하게 나타났다. 유전물질의 기본 발현수준은 농도측정기를 이용하여 평가하였고 발현수준이 가장 낮은 경우를 1이라고 평가하였을 때의 상대 값(relative densitometric value, RDV)으로 평가하였다. 기

Table 3. Radiation Induced Apoptosis in Syngeneic Murine Tumors

Tumors	Radiation induced apoptosis* (%)
Oca-I	16.2±3.3
Mca-K	0.5±0.2
Fsa-II	1±0.2
SCC-VII	0.3±0.1
Hca-I	0.3±0.1

\*shown in mean±SE

본 발현수준의 상대 값은 BAX의 경우에서 동계 마우스 종양에 따라 10배의 차이가 나타나서 가장 많은 차이를 나타냈고 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>와 Bcl-2에서도 약 6배의 차이를 나타냈으며 p53의 경우에는 약 4배의 차이를 보였다. Bcl-x<sub>L</sub>과 Bcl-x<sub>s</sub> 및 p34에서는 2배 이내의 차이를 보임으로써 동계 마우스 종양에 따른 차이가 가장 적었다(Fig. 2).

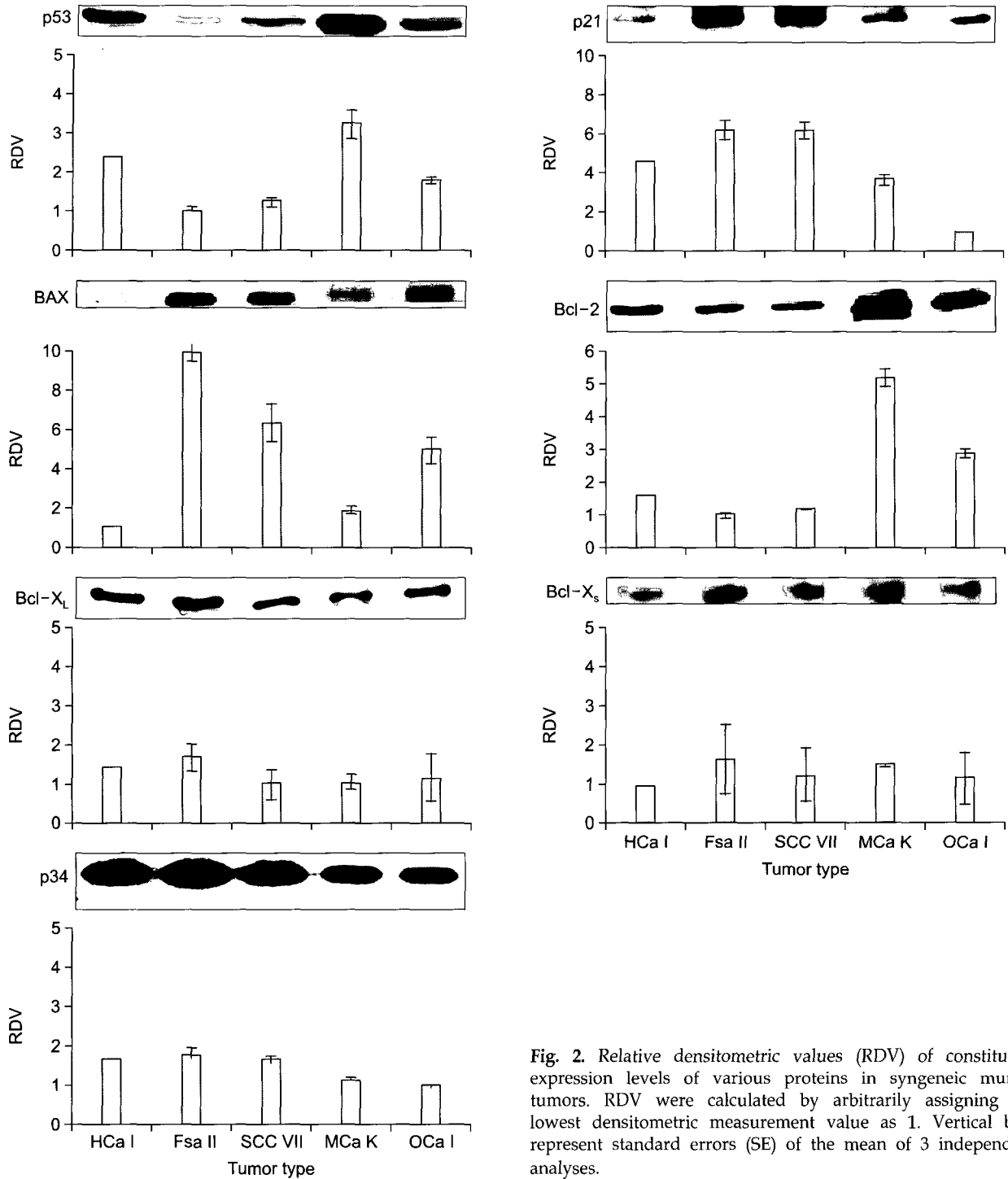
## 3. 상관관계 분석

### 1) 방사선에 의해 유도되는 아포토시스와 50% 종양억제선량 및 종양성장지연 간의 상관관계

방사선에 의해 유도되는 아포토시스와 50% 종양억제선량 및 종양성장지연 간의 상관관계를 알아보았다. 50% 종양억제선량과의 관계에서는 방사선에 의해 유도되는 아포토시스의 양이 많을수록 50% 종양억제선량이 작아지는 즉, 방사선에 민감한 경향을 보였고(R=-0.848) 통계적으로도 변연의 유의성(marginal significant, p=0.070)을 보였다. 종양성장지연과의 관계에서는 방사선에 의해 유도되는 아포토시스의 양이 많을수록 종양성장지연이 오래되는 즉, 방사선에 민감한 경향을 나타내었고(R=0.922) 또한 통계적인 유의성(p=0.026)을 보였다(Fig. 3). 이로써 방사선에 의해 유도되는 아포토시스의 양이 많을수록 방사선 감수성이 높음을 알 수 있었다.

### 2) 유전물질의 기본 발현수준과 50% 종양억제선량, 종양성장지연 및 방사선에 의해 유도되는 아포토시스 간의 상관관계

아포토시스와 관련된 여러 유전물질의 기본 발현수준과 50% 종양억제선량 간의 상관관계에서는 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>과 p34의 기본 발현수준만이 통계적 유의성을 보였다(Fig. 4). 이외에 p53, BAX, Bcl-2, Bcl-2/BAX, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub>와는 통계적 유의성이나 상관관계의 경향을 찾을 수 없었다. p21<sup>WAF1/CIP1</sup>의 기본 발현수준이 낮을수록 50% 종양억제선량이 작아지는, 즉 방사선 감수성이 높아지는 관계가 있음을 알 수 있었다. p34도 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>의 경우와 마찬가지로 기본 발현수



**Fig. 2.** Relative densitometric values (RDV) of constitutive expression levels of various proteins in syngeneic murine tumors. RDV were calculated by arbitrarily assigning the lowest densitometric measurement value as 1. Vertical bars represent standard errors (SE) of the mean of 3 independent analyses.

준이 낮을수록 방사선 감수성이 높아지는 관계가 있음을 알 수 있었다. 종양성장지연과의 관계에서도 50% 종양억제선량에서와 마찬가지로 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>과 p34의 기본 발현수준만이 통계적 유의성을 보였고(Fig. 5) 이외에 p53, BAX, Bcl-2, Bcl-2/BAX, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub>와는 통계적 유의성이나 상

관관계의 경향을 찾을 수 없었다. 50% 종양억제선량에서와 마찬가지로 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>과 p34의 기본 발현수준이 낮을수록 종양성장지연이 오래되는 즉, 방사선 감수성이 높아지는 관계가 있음을 알 수 있었다. 방사선에 의해 유도되는 아포토시스와의 관계에서는 통계적인 유의성을 보이는

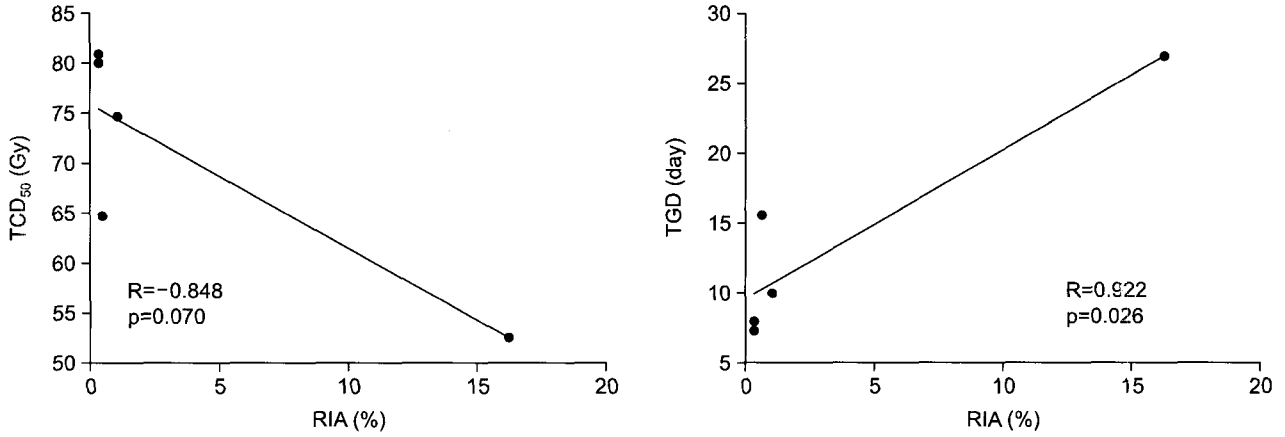


Fig. 3. Relationship between radiation induced apoptosis (RIA) and tumor control dose 50 (TCD<sub>50</sub>) or tumor growth delay (TGD) in syngeneic murine tumors. RIA values showed marginally significant correlation with TCD<sub>50</sub> (R=-0.848, p=0.070) and significant correlation with TGD (R=0.922, p=0.026).

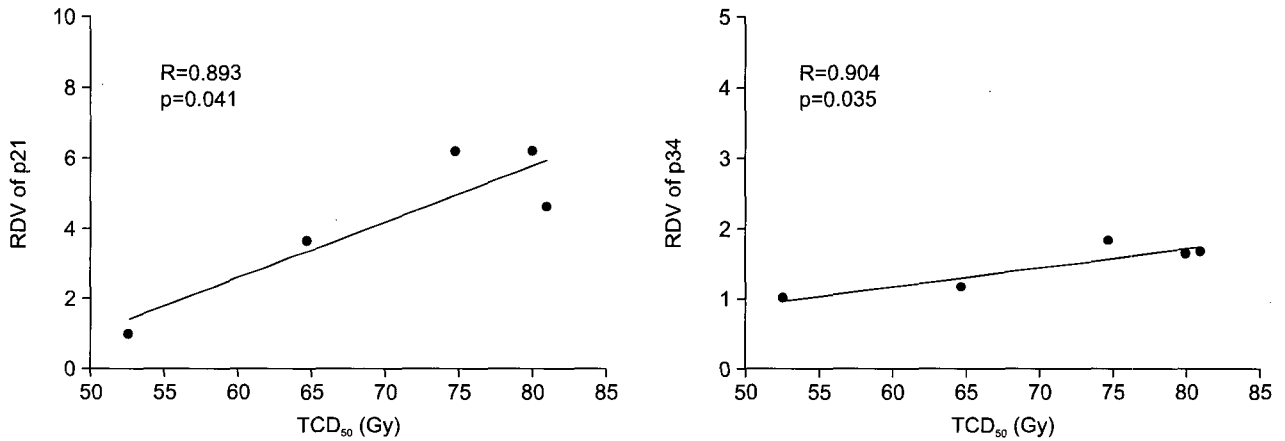


Fig. 4. Relationship between tumor control dose 50 (TCD<sub>50</sub>) and constitutive expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p34 proteins shown as relative densitometric values (RDV) in syngeneic murine tumors. TCD<sub>50</sub> values showed significant positive correlation with p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (R=0.893, p=0.041) and p34 (R=0.904, p=0.035) protein expression.

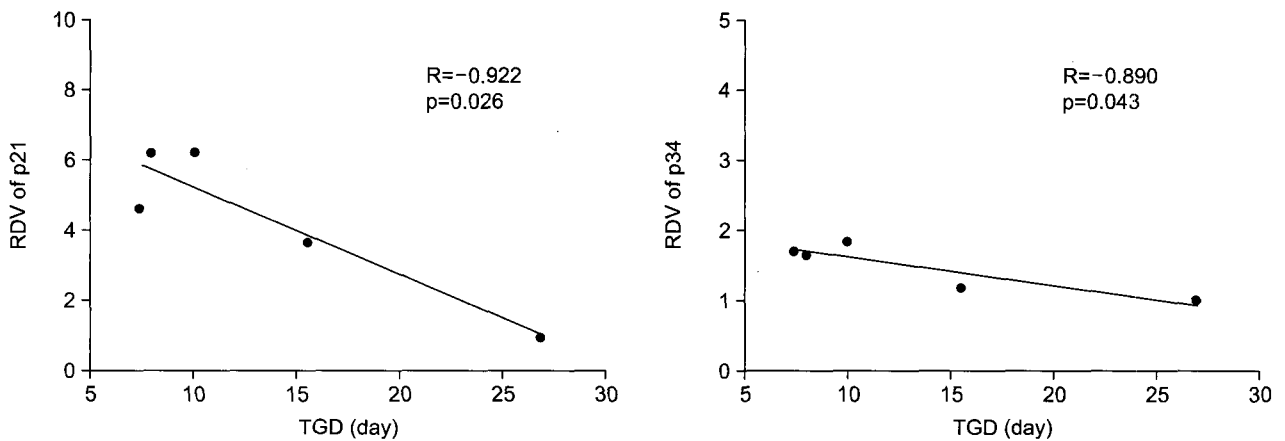


Fig. 5. Relationship between tumor growth delay (TGD) and constitutive expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p34 proteins shown as relative densitometric values (RDV) in syngeneic murine tumors. TGD values showed significant negative correlation with p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (R=-0.922, p=0.026) and p34 (R=-0.890, p=0.043) protein expression.

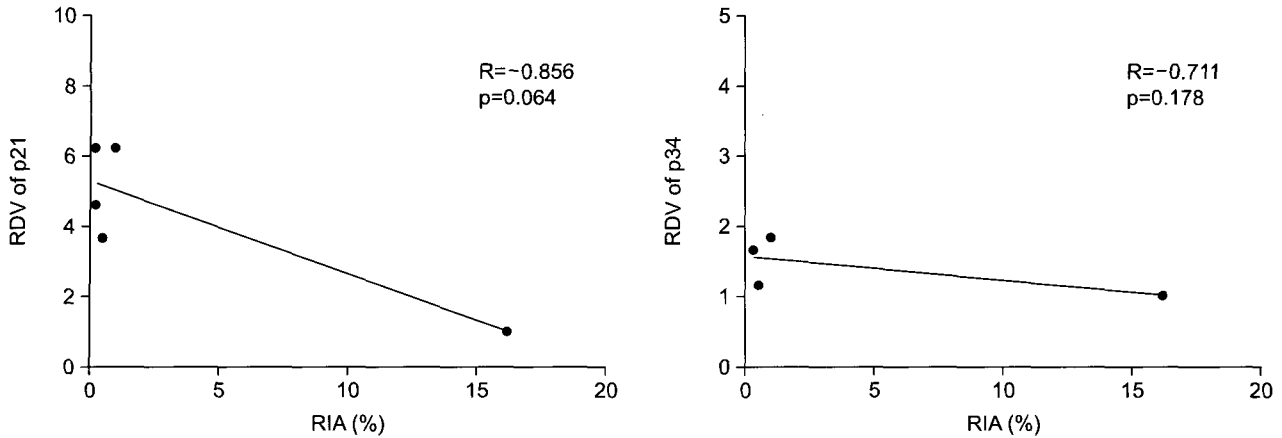


Fig. 6. Relationship between radiation induced apoptosis (RIA) and constitutive expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p34 proteins shown as relative densitometric values (RDV) in syngeneic murine tumors. RIA values showed negative correlation trend with p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (R=-0.856, p=0.064) protein expression.

유전물질은 없었으나 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>은 기본 발현수준이 낮을수록 방사선에 의해 유도되는 아포토시스의 양이 많아지는 경향을 보였고(R=-0.856) 통계적으로도 변연의 유의성(p=0.064)을 보였다(Fig. 6).

### 고안 및 결론

종양의 방사선 감수성에 영향을 미치는 요인들에 대한 연구가 여러 방향에서 진행되고 있고, 주로 세포 주기와 관련된 기전과 아포토시스의 정도 및 관련 유전물질의 활성화 등에 대해서 활발히 진행되는 상황이다. 세포 주기와 관련된 기전 중 G1기 정체는 방사선 저항성의 증가와 연관이 있을 것으로 생각되었지만, G1기 정체의 유무에 따라 방사선 감수성의 차이가 없었다는 보고와<sup>33)</sup> G1기 정체와 방사선 감수성 간에 상관관계가 있다는 보고<sup>16,17,21,34~36)</sup> 등 각각의 실험마다 상이한 연구 결과가 보고되고 있다. 이는 G1기 정체에 p53이 반드시 필요한데 방사선 감수성에 대한 p53의 역할이 세포유형에 따라 다르기 때문으로 생각되고 있다.<sup>37)</sup> G2-M기 정체가 충분치 못하면 아포토시스에 의한 세포사가 많아진다고 알려져 있지만<sup>38,39)</sup> 그 기전은 명확히 밝혀져 있지 못하다.

아포토시스는 세포사의 기전 중 하나로 아포토시스의 정도와 방사선 감수성 사이에 상관관계가 있으며,<sup>40)</sup> 치료 전 아포토시스의 정도로 예후를 예측할 수 있다는 보고와<sup>10)</sup> 아포토시스의 정도가 많을수록 방사선 저항성이 높다는<sup>41,42)</sup> 결과들이 보고되고 있다. 본 연구에서는 방사선에 의해 유도되는 아포토시스의 정도가 많을수록 종양성장지연이 길어지는 상관관계가 존재하였고(R=0.922) 이는 통계적으로

도 의미가 있었다(p=0.026). 또한, 50% 종양억제선량과의 관계에서는 방사선에 의해 유도되는 아포토시스의 정도가 많을수록 50% 종양억제선량은 작아지는 경향이 나타났으나(R=-0.848) 통계적으로는 변연의 유의성(p=0.070)을 보였다. 50% 종양억제선량과의 관계에서 통계적인 유의성이 뚜렷하게 나타나지 못한 이유는 마우스 종양의 종류가 5종으로 표본의 수가 적은 상황에서 OCa-I을 제외한 나머지 4종류의 종양에서 방사선에 의해 유도된 아포토시스의 측정값이 비슷하였기 때문으로 생각된다. 이러한 결과는 방사선에 민감한 난소암 종양에서 방사선에 저항성인 간암 종양보다 방사선에 의한 아포토시스가 쉽게 유도된다는 보고<sup>8)</sup> 및 방사선에 민감한 유방암, 난소암, 림프암 종양에서는 25 Gy의 방사선치료 후 최소 10%의 아포토시스가 관찰되었으나 육종, 편평상피암, 간암 종양에서는 아포토시스가 관찰되지 않았다는 보고와<sup>9)</sup> 일치하는 결과라고 하겠다. 따라서 방사선에 의해 유도되는 아포토시스의 정도로 방사선 감수성을 예측하여 볼 수 있을 것으로 생각한다.

아포토시스가 전체 세포사에서 차지하는 비중은 일부에 불과하지만 이를 조절하는 유전물질들이 밝혀지면서 방사선 감수성과 관련하여 아포토시스의 중요성이 부각되고 있고 또한 방사선 감수성과 아포토시스를 조절하는 유전물질 간의 상관관계에 대한 연구들이 많이 수행되고 있다.<sup>11~29)</sup>

p53은 자연형 상태인 경우 방사선 감수성이 높고 돌연변이형이거나 기능이 없는 경우에는 저항성이 증가한다는 것이 일반적인 견해이었지만, 실험결과는 돌연변이형의 p53에 의해 저항성이 증가하거나<sup>16~19)</sup> 감소<sup>18~21)</sup> 혹은 관련이 없는 것으로<sup>22)</sup> 보고되는 등 각각의 실험마다 상이한 연구 결과가 보고되고 있으며, 이는 방사선 감수성에 대한

p53의 역할이 세포유형에 따라 다르기 때문에 논의되고 있다.<sup>37)</sup> 본 연구에서는 p53의 기본 발현수준과 방사선 감수성 간에는 상관관계가 없었다.

본 연구에서 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>과 p34는 기본 발현수준이 낮을수록 방사선 감수성이 높은 상관관계를 보였는데, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>은 G1기 정체에 관여하는 유전물질로 실험실 내 연구에서 기본 발현수준이 높을수록 항암화학요법에 저항성이 크다고 보고되고 있다.<sup>23-29)</sup> 방사선치료에 대해서도 사람의 대장 종양 세포를 이용한 실험실 내 연구에서 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 유전자가 결손된 종양 세포주의 경우 유전자가 온전한 세포주에 비해 방사선에 의한 아포토시스의 유도가 많았고, 생체 내 실험에서는 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 유전자가 결손된 종양 세포주의 경우 유전자가 온전한 세포주에 비해 방사선 감수성이 높았다고 보고되었다.<sup>27,28)</sup> 또한 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>의 기본 발현수준이 낮을수록 방사선 감수성이 높고, 기본 발현수준이 높을수록 방사선 감수성이 낮다는 보고는<sup>26,43)</sup> 본 연구 결과와 일치한다고 하겠다.

방사선에 의해 유도되는 아포토시스와 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>의 기본 발현수준 간에는 변연의 상관관계가 관찰되었다. 이는 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>의 기본 발현수준이 낮아서 방사선치료로 인한 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>의 활성화가 강하게 나타났던 경우에는 BAX의 발현이 함께 증가하고 Bcl-2의 발현은 변화가 없어서 Bcl-2/BAX가 감소하였고, 높았던 경우에는 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>의 활성화가 나타나지 않고 Bcl-2의 발현이 증가하면서 BAX의 발현은 변화가 없어서 Bcl-2/BAX가 증가했다는 내용과<sup>43)</sup> 일치한다고 하겠다.

p34는 G2 시기에서 M 시기로 이행되는 때에 필요한 유전물질로 알려져 있다. p34와 방사선 감수성 간의 상관관계를 알아본 연구에서, Tamamoto 등<sup>44)</sup>은 방사선 감수성이 다른 HeLa 종양 세포주와 MeWo 종양 세포주를 이용한 연구에서 방사선 저항성이 높은 HeLa 종양 세포주의 경우에는 방사선치료 후 p34의 발현이 있었지만 방사선 저항성이 낮은 MeWo 종양 세포주의 경우에는 발현이 없었다고 보고한 바 있다. Tamamoto 등<sup>44)</sup>의 연구는 p34의 기본 발현수준과의 관계를 나타낸 것은 아니지만 본 연구에서 나타난 p34의 기본 발현수준이 낮을수록 방사선 감수성이 높다는 결과와 부합하는 내용이라 하겠다.

결론적으로 방사선에 의해 유도된 아포토시스의 정도로 종양의 방사선 감수성을 예측하여 볼 수 있을 것으로 생각하며, 종양의 방사선 감수성을 예측할 수 있는 생물학적 표지자로 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>와 p34의 기본 발현수준이 이용될 수 있을 것으로 생각한다. 하지만 본 연구는 방사선 감수성이 서로 다른 동계 마우스 종양 5종류만을 사용한 결과이므

로, 본 연구의 결과가 효과예측시험에 이용되기 위해서는 방사선 감수성이 다양한 더 많은 종류의 종양 세포주를 대상으로 하는 연구 및 실제 임상 연구를 통한 검증이 선행되어야 할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. West CM, Davidson SE, Hendry JH, Hunter RD. Prediction of cervical carcinoma response to radiotherapy. *Lancet* 1991;338:818
2. Höckel M, Knoop C, Schlenger K, et al. Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1993;26:45-50
3. Begg AC, Hofland I, Van Glabekke M, Bartelink H, Horiot JC. Predictive value of potential doubling time for radiotherapy of head and neck tumor patients: Results from the EORTC cooperative trial 22851. *Semin Radiat Oncol* 1992;2:22-25
4. Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schäffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509-4515
5. Giaccia AJ, Brown JM, Wouters B, Cenko N, Koumenis C. Cancer therapy and tumor physiology. *Science* 1998;279:12-13
6. Stausbøl-Grøn B, Overgaard J. Relationship between tumour cell in vitro radiosensitivity and clinical outcome after curative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1999;50:47-55
7. Begg AC, Haustermans K, Hart AAM, et al. The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis. *Radiother Oncol* 1999;50:13-23
8. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, Milas L, Meyn RE. Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res* 1991;127:308-316
9. Meyn RE, Stephens LC, Ang KK, et al. Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies. *Int J Radiat Biol* 1993;34:583-591
10. Wheeler JA, Stephens LC, Tornos C, et al. ASTRO research fellowship: Apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage Ib cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1487-1493
11. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;51:6304-6311
12. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-967
13. El-Deiry Ws, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-825



14. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80:293-299
15. Reed JC. Double identity for proteins of the bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-776
16. Lee JM, Bernstein A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5742-5746
17. McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines: dependence on wild type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res* 1994;54:3718-3722
18. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:3-15
19. Smith ML, Fornace Jr AJ. The two faces of tumor suppressor p53. *Am J Pathol* 1996;148:1019-1022
20. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1996;56:892-898
21. Fan S, Smith ML, Rivert II DJ, et al. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res* 1995;55:1649-1654
22. Brachman DG, Beckett M, Graves D, Haraf D, Vokes E, Weichselbaum RR. p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1993;53:3667-3669
23. Zhang W, Kornblau SM, Kobayashi T, Gambel A, Claxton D, Deisseroth AB. High levels of constitutive WAF1/Cip1 protein are associated with chemoresistance in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 1995;1:1051-1057
24. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996;381:713-716
25. Fan S, Chang JK, Smith ML, Duba D, Fornace Jr AJ, O'Connor PM. Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene* 1997;14:2127-2136
26. Saito Y, Milross CG, Hittelman WN, et al. Effect of radiation and paclitaxel on p53 expression in murine tumors sensitive or resistant to apoptosis induction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:623-631
27. Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, et al. Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nature Med* 1997;3:1034-1036
28. Wouters BG, Giaccia AJ, Denko NC, Brown JM. Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res* 1997;57:4703-4706
29. Ruan S, Okcu MF, Ren JP, et al. Overexpressed WAF1/Cip1 renders glioblastoma cells resistant to chemotherapy agents 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin. *Cancer Res* 1998;58:1538-1543
30. Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, Milas L, Meyn RE. Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiat Res* 1993;135:75-80
31. Milas L, Wike J, Hunter N, Volpe J, Basic I. Macrophage content of Murine sarcomas and carcinomas: associations with tumor growth parameters and tumor radiocurability. *Cancer Res* 1987;47:1069-1075
32. Milas L, Hunter NR, Mason KA, Milross CG, Saito Y, Peters LJ. Role of reoxygenation in induction of enhancement of tumor radioresponse by paclitaxel. *Cancer Res* 1995; 55:3564-3568
33. Silchenmyer WJ, Nelson WG, Slebos RJ, Kastan MB. Loss of a p53 associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res* 1993;53: 4164-4168
34. Pardo FS, Su M, Borek C, et al. Transfection of rat embryo cells with mutant p53 increases the intrinsic radiation resistance. *Radiat Res* 1994;140:180-185
35. Russell KJ, Wiens LW, Demers GW, Dalloway DA, Plon SE, Groudine M. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint deficient and G1 checkpoint competent cells. *Cancer Res* 1995;55:1639-1642
36. O'Connor PM, Jackman J, Jondle D, Bhatia K, Magrath I, Kohn KW. Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res* 1993;53:4776-4780
37. Maity A, Kao GD, Muschel RJ, McKenna WG. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:639-653
38. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828
39. Jin P, Gu Y, Morgan DO. Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation induced G2 arrest in human cells. *J Cell Biol* 1996;134:963-970
40. Wu HG, Kim IH. Significance of apoptotic cell death after  $\gamma$ -irradiation. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2001;19:252-258
41. Leoncini L, Vecchio MTD, Megha T, et al. Correlation between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1993;142:755-763
42. Lera J, Lara PC, Perez S, Cabrera JL, Santana C. Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma. *Cancer* 1998;83:2493-2501
43. Akimoto T, Seong J, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Milas L. Association of increased radiocurability of murine carcinomas with low constitutive expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> protein. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:413-419
44. Tamamoto T, Ohnishi K, Takahashi A, et al. Correlation between  $\gamma$ -ray induced G2 arrest and radioresistance in two human cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44: 905-909

— Abstract —

## Biological Markers as Predictors of Radiosensitivity in Syngeneic Murine Tumors

Sei Kyung Chang, M.D.\*<sup>†</sup>, Jinsil Seong, M.D.<sup>†</sup>, Sung Hee Kim, B.S.<sup>†</sup> and Hyun Soo Shin, M.D.\*

Department of Radiation Oncology, \*Pochon CHA University, Bundang CHA General Hospital, Seongnam,  
<sup>†</sup>Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei Cancer Center,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** We investigated whether a relationship exists between tumor control dose 50 (TCD<sub>50</sub>) or tumor growth delay (TGD) and radiation induced apoptosis (RIA) in syngeneic murine tumors. Also we investigated the biological markers that can predict radiosensitivity in murine tumor system through analysis of relationship between TCD<sub>50</sub>, TGD, RIA and constitutive expression levels of the genetic products regulating RIA.

**Materials and Methods:** Syngeneic murine tumors such as ovarian adenocarcinoma, mammary carcinoma, squamous cell carcinoma, fibrosarcoma, hepatocarcinoma were used in this study. C3H/HeJ mice were bred and maintained in our specific pathogen free mouse colony and were 8~12 weeks old when used for the experiments. The tumors, growing in the right hind legs of mice, were analyzed for TCD<sub>50</sub>, TGD, and RIA at 8 mm in diameter. The tumors were also analyzed for the constitutive expression levels of p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, BAX, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub>, and p34. Correlation analysis was performed whether the level of RIA were correlated with TCD<sub>50</sub> or TGD, and the constitutive expression levels of genetic products regulating RIA were correlated with TCD<sub>50</sub>, TGD, RIA.

**Results:** The level of RIA showed a significant positive correlation (R=0.922, p=0.026) with TGD, and showed a trend to correlation (R=-0.848), marginally significant correlation with TCD<sub>50</sub> (p=0.070). It indicates that tumors that respond to radiation with high percentage of apoptosis were more radiosensitive. The constitutive expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p34 showed a significant correlation either with TCD<sub>50</sub> (R=0.893, p=0.041 and R=0.904, p=0.035) or with TGD (R=-0.922, p=0.026 and R=-0.890, p=0.043). The tumors with high constitutive expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> or p34 were less radiosensitive than those with low expression.

**Conclusion:** Radiosensitivity may be predicted with the level of RIA in murine tumors. The constitutive expression levels of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> or p34 can be used as biological markers which predict the radiosensitivity.

**Key Words:** Radiosensitivity, Murine tumors, Biological markers, Apoptosis