— J. Korean Soc Ther Radiol Oncol : Vol. 16, No. 2, June, 1998 —

1) 인체 암세포주에서 방사선감수성의 지표간의 상호관계

충북대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 신경외과학교실*

박 우 윤·김 원 동·민 경 수*

Correlation Between the Parameters of Radiosensitivity in Human Cancer Cell Lines

Woo Yoon Park, M.D., Won Dong Kim, M.D., and Kyung Soo Min, M.D.*

Departments of Therapeutic Radiology, Neurosurgery, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea*

Purpose: We conducted clonogenic assay using human cancer cell lines (MKN-45, PC-14, Y-79, HeLa) to investigate a correlation between the parameters of radiosensitivity.

Materials and Methods : Human cancer cell lines were irradiated with single doses of 1, 2, 3, 5, 7 and 10Gy for the study of radiosensitivity and sublethal damage repair capacity was assessed with two fractions of 5Gy separated with a time interval of 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 24 hours. Surviving fraction was assessed with clonogenic assay using Sperman-K rber method and mathematical analysis of survival curves was done with linear-quadratic (LQ), multitarget-single hit(MS) model and mean inactivation dose( ).

Results : Surviving fractions at 2Gy(SF2) were variable among the cell lines, ranged from 0.174 to 0.85. The SF2 of Y-79 was lowest and that of PC-14 was highest(p<0.05, t-test). LQ model analysis showed that the values of α for Y-79, MKN-45, HeLa and PC-14 were 0.603, 0.356, 0.275 and 0.102 respectively, and those of β were 0.005, 0.016, 0.025 and 0.027 respectively. Fitting to MS model showed that the values of Do for Y-79, MKN-45, HeLa and PC-14 were 1.59, 1.84, 1.88 and 2.52 respectively, and those of n were 0.97, 1.46, 1.52 and 1.69 respectively. The s calculated by Gauss-Laguerre method were 1.62, 2.37, 2.61 and 3.95 respectively. So the SF2 was significantly correlated with α, Do and . Their Pearson correlation coefficiencics were -0.953 and 0.993, 0.999 respectively(p<0.05). Sublethal damage repair was saturated around 4 hours and recovery ratios (RR) at plateau phase ranged from 2 to 3.79. But RR was not correlated with SF2, α, β, Do, .

Conclusion : The intrinsic radiosensitivity was very different among the tested human cell lines. Y-79 was the most sensitive and PC-14 was the least sensitive. SF2 was well correlated with α, Do, and . RR was high for MKN-45 and HeLa but had nothing to do with radiosensitivity parameters. These basic parameters can be used as baseline data for various in vitro radiobiological experiments.

Key Words: Radiosensitivity, Sublethal damage repair, MKN-45, PC-14, Y-79, HeLa

서 론

최근들어 방사선치료의 효과를 예측하는 방법으로서 내재적 방사선감수성(intrinsic radiosensitivity), 저산소세포분획(hypoxic cell fraction), potential doubling time 등과 같은 방사선생물학적 인자에 대한 관심이 높아지고 있으며 특히 암세포의 방사선감수성

이 논문은 1996년도 충북대학교병원 임상연구비에 의하여 연구되었음.
이 논문은 1998년 1월 17일 접수하여 1998년 3월 4일 채택되

이 주목받고 있다. 이는 여러 방사선민감제의 사용여부 및 방사선치료 방법을 결정하기 위한 기초 자료로서 각종 암의 방사선 감수성을 미리 파악하는 것이 매우 중요하기 때문이다.[1-3] 일반적으로 방사선감수성에 대한 고전적 의미의 Bergonie-Tribondeau의 법칙은 오래 전부터 잘 알려져 왔다. 즉 조직의 재생능력이 클수록, 세포분열기간이 짧을수록, 형태적, 기능적으로 미분화일수록, 분열능이 왕성하고 분화도가 낮은 세포일수록 방사선감수성이 높다는 것이다. 그러나 이런 단편적인 이론으로는 각종 암세포의 구체적인 방사선 감수성의 측정이 불가능하였다. 현재에는 거의 모든 암세포에 대한 세포배양이 가능하게 되어 세포의 생존능력을 객관적으로 평가한 생존곡선이 방사선감수성을 측정하는데 이용되어지고 있으며 방사선에 의한 DNA 손상 회복능력의 차이가 방사선감수성을 결정하는 중요한 기전임이 보고되고 있다.[4, 5]

이에 저자는 4가지의 인체 암세포주(위선암 MKN-45, 폐선암 PC-14, 망막세포종 Y-79, 자궁경부 편평상피암 HeLa)에서 세포생존분획 및 세포생존곡선의 모양을 결정하는 여러 지표를 구하고 준치사손상 회복정도를 측정하여 각종 세포생존 지표간의 상관관계를 분석하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대 상

본 실험에서는 4종류의 인체 암세포주(분화도가 낮은 위선암 세포주 MKN-45, 폐 선암 세포주 PC-14, 망막세포종에서 유래된 Y-79, 자궁경부에서 수립된 편평상피암 세포주 HeLa)를 사용하였다. 이들 세포주는 모두 배양용기의 기저면에서 단층으로 증식하는 특성을 갖고 있다. 배지는 RPMI-1640(GIBCO, USA)에 fetal bovine serum(GIBCO, USA) 10%, $NaHCO_3$ (Merk, Germany) 24mM/l, HEPES 완충액(Sigma, USA) 20mM/l 및 penicilline-streptomycin(GIBCO, USA) 1×10^2U/ml 등을 첨가하여 사용하였다. 기저면의 면적이 25cm^2인 T-25 플라스크 (NUNC, USA)를 배양용기로 사용하고 5% CO_2 및 37° 조건에서 배양하였다.

본 실험에서는 지수증식기의 세포를 사용하였다. 배지 5ml가 들어있는 T-25 플라스크에 5×10^4개의 활성세포를 넣고 배양시작 후 새로운 배지를 전혀 첨가하지 않는 방법(unfed culture)으로 배양하여 배양시간과 전체 활성세포수를 반대수 도표상에 표시하였다. T-25 플라스크내의 활성세포수가 지수적으로 증가하고 있는 시기의 중기(mid-exponential phase)인 배양 후 제 3일의 세포를 지수 증식기 세포로 정하였다.

세포수는 trypan blue exclusion방법을 이용하여 활성세포(viable cell)만 계측하였다. 즉 T-25 플라스크내의 배지를 제거하고 기저면의 세포를 멸균된 phosphate buffered saline(PH 7.2)으로 2-3회 세척 후 0.05% typsin(1 : 250)-0.53mM EDTA 혼합액(GIBCO, USA) 0.25ml를 가하여 세포배양기내에 5내지 7분간 방치하여 세포를 기저면에서 분리시켰다. 이후 새로운 배양액 5ml를 T-25 플라스크에 넣어 trypsin의 작용을 중지시키고 5-6회 피펫팅하여 세포가 서로 분리되도록 하였다. 이러한 단일 세포 혼탁액(single cell suspension) 50μl에 0.4% trypan blue (GIBCO, USA) 동량을 micro-pipette으로 5-6회 혼합시킨후 hemocytometer(Neubauer, USA)의 2 chamber에 각각 넣고 현미경으로 관찰하여 trypan blue에 청색으로 염색된 세포를 비활성세포로, 염색되지않은 세포를 활성세포로 간주하여 세포수를 계측하였다.

2. 방사선조사

6MV Siemens LINAC 방사선치료기를 사용하여 실온에서 방사선조사를 시행하였다. 선형가속기의 gantry를 180° 돌려서 후방조사를 시행하였으며 96-well microplate 아래에는 1.5cm 상당의 조직등가물질을 놓아서 최고 흡수선량이 기저면 즉 세포가 위치한 곳에 위치하도록 하였고 산란선을 충분히 받을수 있도록 10cm 두께의 조직 등가 물질을 위에 올려놓았다. 방사선의 조사야는 30×30cm 이었고 1.5cm 깊이를 기준으로 원하는 선량을 조사하였으며 이때 분당 선량율은 300cGy/min이었다. 1, 2, 3, 5, 7, 10Gy의 방사선량을 1회(single dose) 조사한 실험군과 방사선을 조사하지 않은 대조군 모두 96-well microplate에 세포를 분배한 때부터 방사선을 조사한 후 plate를 세포배양기에 넣을 때까지의 시간을 동일하게 하였다. 실험은 각 방사선량에 따라 3회 반복 시행하였다.

3. 세포 생존과 생존분획

세포생존율은 Spearman-K rber법에 의해 산출하였다[6]. 초기 세포수, 열(column)의 수, 그리고 공급세포층 효과(feeder layer effect)를 확인하기 위하여 8개의 96-well microplate를 사용하여 예비실험을 시행하였다. 96-well microplate의 제 1열(종열 : column)의 8개의 각각의 well에 100μl의 배양액에 1×10^6개의 세포가 들어가게한 후 2개의 plate에 연속하여 제

24열까지 열마다 1/2씩 세포수가 희석되도록 하였다. 공급세포층 효과를 확인하기 위해서 희석된 활성세포가 들어있는 plate의 각 well에서의 총 세포수가 1×10^6개가 되도록 80Gy의 방사선을 조사하여 불활성화된 세포를 100μl의 부피로 하여 각 well 마다 넣고, 대조군의 plate에는 배양액만 100μl씩 주입하였다. 같은 방법으로 하여 세포가 들어있는 각 4개의 plate를 대조군과 방사선조사(12Gy)군으로 나누어 14일 동안 세포배양기에서 배양하여 위상차현미경(Biostar, 미국 American Optical사 제품)으로 관찰하여 50개 이상의 세포로 이루어진 세포집락을 세포가 증식한 것으로 판정하였다. 세포집락이 형성된 well의 범위로부터 각 세포주에 따른 96-well microplate에서의 초기 세포수, 열의 수, 공급세포층 효과유무를 확인하여 본 실험에 임했다. Sperman-K rber법에 의한 생존분획(Survival fraction; SF)의 계산은 다음과 같다.

Ψ = exp(-0.577-(xo+d/2-dΣPi))

xo = ln z(z : 96-well microplate에서 제 1열의 각 well당 세포수=20,000)

d = ln a (a : 희석인자=2)

Pi = Ri/Ni (=열당 양성율)

Ri = 세포집락이 형성된 well 수

Ni = 종열 당 well의 수 (=8)

Table 1. Survival Fractions(Means±SE) of Exponential-Phase Human Cancer Cell Lines

Dose(Gy)	Cell lines			
	MKN-45	PC-14	Y-79	HeLa
1	0.756±0.147	0.803±0.098	0.720±0.280	0.803±0.026
2	0.367±0.073	0.850±0.150	0.174±0.076	0.457±0.033
3	0.248±0.057	0.690±0.180	0.110	0.325±0.012
5	0.143±0.077	0.356±0.154	0.053±0.021	0.132±0.017
7	0.075±0.072	0.058	0.021±0.011	0.045±0.005
10	0.003±0.001	0.037	0.001	0.006±0.003

SF = Ψirrad/Ψcontrol

4. 세포 생존 모형에 의한 분석

방사선량(D; Gy)과 세포의 생존분획(SF)간의 관계를 분석하는데 유용한 2가지의 생존곡선 모형에 따라 1회 방사선 조사후 얻은 자료를 선형 회귀시켜 각 지표를 얻었다. 우선 linear-quadratic(LQ) 모형의 수식인 $\ln SF=-(\alpha D+\beta D^2)$에 따라 α(linear inactivation coefficient; Gy^{-1})와 β(quadratic inactivation coefficient; Gy^{-2})를 구하고 multitarget-single hit(MS) 모형의 수식인 $SF=1-(1-e^{-D/Do})^n$에 따라 생존분획이 0.1 이하인 자료로부터 Do(mean lethal dose; Gy)와 n(target number, extrapolation number)을 구하였다. 한편 mean inactivation dose( )는 Gauss-Laguerre방법(12 point formula)[7]을 이용하여 선형좌표상에 나타난 LQ 모형의 곡선을 0에서 까지 적분하여 구하였다.

5. 준치사손상 회복량의 측정

5Gy의 방사선량을 2회 분할조사하여 그 간격동안에 각 세포가 받은 준치사손상이 회복되는 정도를 측정하였다. 분할조사 간격은 0, 1, 2, 3, 4, 6, 24시간으로 정하였으며 각 실험은 분할조사 간격에 따라 3회 반복 시행하였다. 분할조사후에 얻은 생존분획과 분할조사 간격이 0인 생존분획의 비를 다음의 수식에 따라 산출하였으며 이를 준치사손상이 회복된 양 즉 회복비(recovery ratio; RR)로 정의 하였다.

$$RR=\frac{SF_{(i=T)}\ [=\text{분할조사 간격이 T시간인 실험군의 생존분획}]}{SF_{(i=0)}\ [=\text{분할조사 간격이 0시간인 실험군의 생존 분획}]}$$

결 과

1. 방사선 감수성 양상

2Gy에서의 세포생존분획(SF2)은 Y-79에서 0.174, MKN-45에서 0.367, HeLa에서 0.457, PC-14에서 0.850이었다. 특히 Y-79와 PC-14가 다른 두가지 인체 상피암 세포주에 비해 통계학적으로 유의하게 다른 SF2를 보였고($p<0.05$, t-test) 이와같은 경향은 선량이 증가하여도 그대로 유지되었다(Table 1). 세포생존곡선은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 초기 저선량 부위에서는 곡선 모양의 어깨(shoulder)가 나타나고 고선량으로 갈수록 직선으로

이

행되었다. 다만 4가지의 세포주중 Y-79에서는 저선량부위의 곡선부위가 나타나지 않아 거의 모든 선량에서 직선을 나타내었다. 직선부분의 기울기는 PC-14가 가장 완만하였고 Y-79에서는 가장 급격하였다. MKN-45는 초기 곡선부분은 뚜렷하나 고선량에서의 직선부위 기울기가 급해져 HeLa의 생존곡선과 교차가 일어났다. Y-79, MKN- 45, HeLa, PC-14에서 LQ 모형 분석 결과 α는 각각 0.603, 0.356, 0.275, 0.102였고 β는 각각 0.005, 0.016, 0.025, 0.027였으며 MS 모형 분석 결과, Do는 각각 1.59, 1.84, 1.88, 2.52였고 n은 각각 0.97, 1.46, 1.52, 1.69였다. 한편 계산된 mean inactivation doses( )는 Y-79, MKN-45, HeLa, PC-14에서 각각 1.62, 2.37, 2.61, 3.95였다. SF2가 낮은 Y-79의 α값이 현저히 높았고 Do, 값은 가장 낮았으며, SF2가 높은 PC-14는 그 반대였다(Table 2). 방사선 생존곡선의 제지표와 SF2와의 상관관계를 본 결과 가장 깊은 상관관계를 보인 것은 였으며 (Pearson correlation coefficiency 0.999, p=0.001), LQ모형의 α값 및 MS 모형의 Do값도 밀접한 상관관계를 보였다(Pearson correlation coefficiency -0.953, p=0.047 for SF2 vs α; Pearson correlation coefficiency 0.993, p=0.007 for SF2 vs Do). 또한 α, Do, 각 지표 서로간에도 의미있는 상관관계를 보였다. 한편 LQ 모형에서 고선량부위의 굴곡을 결정하는 β는 MS 모형에서 어깨의 크기를 결정하는 target number, n과 유의한 상관관계를 나타내었다(Pearson correlation coefficiency 0.957, p=0.044)(Table 3).

2. 준치사손상 회복 양상

분할조사에 의한 준치사손상으로부터의 회복은 약 2시간 내외에 50

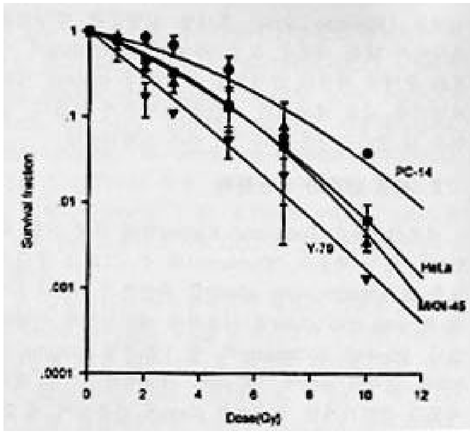

Fig. 1. Cell survival curves of 4 human cancer cell lines to irradiation.

Table 2. Parameters(with 95% CI) of Cell Survival Curves of Exponential-Phase Human Cancer Cell Lines

Parameters	Cell lines			
	MKN-45	PC-14	Y-79	HeLa
α (Gy^{-1})	0.356 (0.501 - 0.211)	0.102 (0.234 -0.031)	0.603 (0.901-0.304)	0.275 (0.354-0.196)
β (Gy^{-2})	0.016 (0.042 -0.010)	0.027 (0.051-0.003)	0.005 (0.058 -0.049)	0.025 (0.039-0.011)
Do(Gy)	1.84 (2.56-1.43)	2.52 (3.54-1.96)	1.59 (1.98-1.34)	1.88 (2.09-1.71)
n	1.46 (3.45-0.62)	1.69 (3.20-0.90)	0.97 (1.90-0.49)	1.52 (2.04-1.13)
(Gy)	2.37	3.95	1.62	2.61

Table 3. Pearson Correlation Coefficiencies(τ) among Radiosensitivity Parameters and Recovery Ratio(RR)

		SF2	α	β	Do	n	
α	τ	-0.953					
	p	0.047					
β	τ	0.863	-0.918				
	p	0.138	0.082				
Do	τ	0.993	-0.963	0.798			
	p	0.007	0.038	0.202			
n	τ	0.873	-0.901	0.957	0.829		
	p	0.124	0.123	0.044	0.171		
	τ	0.999	-0.960	0.867	0.992	0.887	
	p	0.001	0.040	0.133	0.008	0.113	
RR	τ	-0.479	0.196	-0.053	-0.540	0.011	-0.451
	p	0.521	0.804	0.947	0.460	0.990	0.549

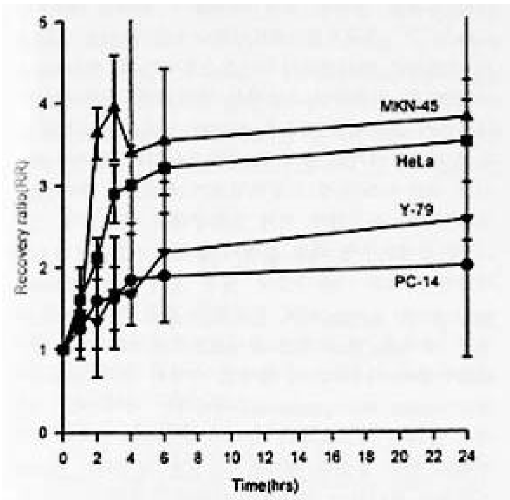

Fig. 2. Changes in recovery ratio of 4 human cancer cell lines according to time interval with split dose irradiation.

%에 도달하였으며 약 4시간 후에는 회복량이 거의 포화상태에 이르렀다. 포화상태의 recovery ratio(RR)은 PC-14이 2, Y-79가 2.56, HeLa가 3.5 그리고 MKN-45가 3.79였다(Fig. 2). 위에서 언급한 4가지 암세포주의 방사선감수성의 차이와 준치사손상 회복정도의 연관성을 보기위해 SF2, α, β, Do,   과 RR과의 Pearson 상관계수를 계산하여 보았으나 상호간에 의미있는 관계를 얻지 못했다(Table 3).

고안 및 결론

방사선치료의 효과에는 종양크기, 암의 조직학적 종류 및 분화정도, 저산소세포 분획, 종양의 증식속도, 총 방사선량 및 분할조사 방법 등 많은 인자가 관여한다.[8] 그러나 무엇보다도 암세포는 매우 다양한 고유의 내재된 방사선감수성을 가지고 있으며 이는 방사선치료의 결과를 좌우하는 중요한 인자이다. 이러한 방사선감수성을 객관적으로 표현하기하기 위해 전통적으로 많이 사용되어 온 것이 multitarget-single hit(MS) 모형과 linear-quadratic(LQ) 모형이다.[8-11] 그러나 이러한 모형에서의 각각의 지표들 즉 Do, n(MS 모형) 또는 β(LQ 모형)는 생존곡선의 고선량 부위의 특성을 대변하는 단점이 제기 되었으며 또한 이러한 지표들의 실험에 따르는 변이계수가 60% 내외로 방사선감수성을 대표하는 지표로 삼기에는 여러 문제가 있었다. 이에 변이계수가 적은 하나의 수치로 방사성감수성을 나타내려는 시도로 mean inactivation dose(   )가 도입되었으며 현재 ICRU에서도   의 사용을 적극 권하고 있다. 이   는 선형좌표상에서 LQ 모형에 의하여 만들어지는 생존곡선 아래부분의 면적(area under curve)을 나타내며 따라서 고선량부위 즉 LQ 모형에서 지속적으로 굴곡되는 부위의 영향이 상대적으로 적어진다. 따라서 이   는 주로 저선량부위의 반응에 민감하며 세포주의 종류에 따르는 방사선감수성을 잘 반영하는 지표라고 알려져 있다.[7,8] 또한 어깨가 거의 나타나지 않는 생존곡선 즉 n이 1 보다 작은 경우에는   가 Do와 같아짐으로써 n으로는 감별하기 힘든 방사선감수성도   로는 판별이 가능하다.

여러 연구로부터 실제 임상에서의 방사선치료 효과는 생존곡선의 초기 기울기 즉 SF2와 관계가 있다는

것이 밝혀졌다.[2] 대개 임상에서 쓰이는 분할조사량이 2Gy 내외이고 근치목적의 치료에서는 수십회 이상의 분할조사가 시행됨을 고려할 때 SF2의 미세한 차이는 치료결과에 지대한 영향을 미칠 수 있으며 따라서 SF2는 임상 반응정도를 결정하는 중요한 인자이다. 그밖에 방사선치료에 사용되는 총 조사량과 방사선 생물학적 측면에서의 내성량의 측정지표가 모두 1.8-2Gy의 분할조사량을 기준으로 하고 있으며 실제 환자의 국소치유율과 동일종양의 SF2는 서로 잘 일치하므로 방사선치료전 방사선감수성을 예측할 수 있는 검사로서의 SF2의 필요성이 더욱 강조된다. 본 연구에서의 SF2를 기준으로한 방사선감수성은 Y-79가 현저히 높았고 PC-14가 낮았으며 MKN-45와 HeLa는 중등도의 방사선감수성을 나타내었다. 이는 인체 암세포의 종류에 따라 매우 다양한 방사선감수성을 가지고 있음을 분명하게 보여준다. 또한 방사선 생존곡선의 제 지표중에선 , LQ모형의 α값과 MS 모형의 Do값이 SF2와 밀접한 상관관계를 보였으며 특히 Do값이 고선량부위로 부터 유래된 수치인데 반하여 과 α값은 저선량부위의 반응을 나타내는 지표이므로 SF2와의 유관성은 더 크다 하겠다. 그밖에 α, Do, 사이에도 서로간에 의미있는 상관관계를 나타냈다.

한편 Malaise 등은 같은 조직학적 유형내에서도 다양한 SF2를 나타낸다는 것을 보고하였으며 가장 방사선감수성이 높은 교아세포종이 가장 방사선감수성이 낮은 임파종과 거의 비슷한 SF2값을 나타낼 수 있다고 하였다.[12, 13] 또한 Fertil 등은 같은 HeLa 세포주내에서도 보고자에 따라 SF2가 0.27에서부터 0.52까지 매우 다양하게 관찰되는 것을 밝혔으며 이는 상당부분 기술적인 문제(세포배양의 방법, feeder cell의 사용여부등)와 연관되어 있었다.[2] 그러나 여러 기관의 자료를 수집하여 분석한 결과를 보면 이러한 기술적인 문제들은 생존곡선의 저선량 부위(SF2) 보다는 고선량부위(SF8)에 더 많은 영향을 미치것으로 밝혀졌으며 수집되어진 SF2의 변이 계수는 17%에 불과하였으나 SF8의 변이계수는 100%에 달하였다. 이는 고선량에서의 생존분획이 일부분의 작은 세포수에 의하여 좌우되고 실험여건에 따라 심하게 변동될 수 있음을 나타낸다. 따라서 SF8 보다는 SF2가 세포주의 종류에 따르는 방사선감수성을 잘 반영하는 지표이며 95% 종양치유선량(95% tumor control dose) 즉 치료효과와도 연관되어져 있다.[2, 14] 다만 이러한 조직학적 유형에 따른 방사선감수성(SF2)을 판단함에 있어 다음의 몇가지 사항을 염두에 두어야 한다. 첫째 모든 암종류에 대해서 암세포주가 성립되어 있지 않고 그 암세포주가 수립된 종양에 대한 임상적 방사선감수성에 대한 자료가 부족하다는 것이고 둘째는 생체내에서와는 달리 세포배양하에서는 암세포의 형태가 변하게 되며 대개 좀더 미분화된 양상을 나타낸다는 것이다. 마지막으로 세포배양하에서 보다 생체 내(tumor xerograft)에서 측정한 SF2가 높은 것으로 되어있으며 그 이유로는 부분적 저산소증, 잠재치사손상 회복, 접촉저항성(contact resistance) 등이 거론되고 있다. 그러나 이러한 방사선감수성에 영향을 미치는 여러 요인들이 임상적 방사선반응성 및 SF2와의 명확한 인과관계를 약화시키지는 않는 것으로 사료되며 다만 SF2의 절대치를 측정하여 근치적 방사선치료의 생물학적 모형을 제시하는데는 문제가 있을 것이다.[13]

이러한 방사선 감수성 차이의 기전으로서 각 세포마다 고유한 방사선 손상 회복능의 차이가 제시되고 있다.[5, 15-17] 중등도의 방사선감수성을 보이는 대부분의 세포들은 방사선조사후 1.5-2.5시간 후 준치사손상의 50%를 회복하며 4-6시간 배양하면 준치사손상의 대부분이 회복되는 것으로 알려져 있다. 본 실험의 모든 암세포주에서도 준치사손상으로부터의 회복이 약 2시간 내외에 50%에 도달하였으며 4-6시간 후에는 준치사손상의 회복량이 거의 포화상태에 이르렀다. 그러나 각 암세포주에 따른 절대적 회복비는 2내지 3.79의 다양한 차이를 나타내었다. 한편 잠재치사손상(potentially lethal damage)의 회복량이 많은 경우 악성 흑색종, 골육종 및 다형성 교아세포종에서와 같이 방사선감수성이 매우 낮고, 방사선 손상이 전혀 회복되지 않는 ataxia telangiectasia환자에서는 방사선감수성이 매우 높다는 보고로부터 방사선 손상으로부터의 회복능력과 회복 속도가 방사선감수성을 결정하는 중요한 기전중의 하나라고 생각하게 되었다.[16, 18-21]

최근의 Fertil 등의 보고에서도 유전적 기원이 다른 46종의 섬유아세포를 대상으로 방사선 회복능력을 측정한 결과 지수증식기 세포의 방사선감수성이 낮을수록 회복능력이 우수하였다.[19] 그러나 그후에 Deschavanne 등은 22개의 암세포주에 대하여 19개의 논문을 비교하여 방사선 손상회복력과 방사선감수성 및 방사성반응성과의 관계를 연구한 바 서로 상관관계가 없음을 발표하였으며[22] 본 연구에서도 방사선감수성의 차이와 준치사손상 회복정도의 연관성을 보기위해 SF2, α, β, Do, 와 RR과의 상관관계를 살펴보았으나 의미있는 결과를 얻지 못했다. 이는 본 세포주에서는 방사선감수성에 손상회복이 크게 기여하지 못함을 알려준다. LQ모형에 따르면 방사선 준치사손상의 회복은 DNA break의 repair가 multiple tract damage사이에 일어남으로써 발생한다고 가정하며 이는 곧 β에 비례하고 분할조사량의 제곱에 비례한다. 반면 내재적 방사선감수성을 대표하는 SF2는 저선량 부위의 지표인 α가 주로 영향을 미치므로 회복정도와 방사선 감수성사이에는 괴리가 생길 수 있으리라 사료된다. 그러나 현재로서는 ataxia telangiectasia나 xeroderma pigmentosum과 같이 잠재치사손상 회복력의 결핍이 방사선감수성의 증가를 가져온다는 직접적인 증거가 있는 한 방사선 손상 회복력과 방사선감수성의 관계를 전면 부정하기는 힘든 상태이다.

결론적으로 본 실험에서 사용한 인체의 각 세포주사이에서는 그 기원에 따라 방사선감수성 및 방사선 손상 회복력에 현격한 차이를 나타내었으며 방사선감수성의 제 지표간에는 상호간에 의미있는 상관관계가 있었다. 따라서 방사선치료전에 간단한 예측검사(predictive assay)로서 이러한 세포의 내재된 방사선감수성을 미리 파악할 수 있다면, 각 환자마다 가장 적절한 치료방법을 강구할 수 있게 될 것이며 상기의 여러 지표들은 향후 방사선치료 효과를 높이기 위한 방사선생물학 실험의 기초자료로서도 이용되어 질 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. **Fertil B, Deschavanne PJ, Lachet B.** In vitro radiosensitivity of six human cell lines. A comparative study wih different statistical models. Radiat Res 1980; 82:297-309
2. **Fertil B, Malaise EP.** Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1981; 7:621- 629
3. **Peters LJ.** Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response. Radiother Oncol 1990; 17:177-190
4. **Weichselbaum RR, Nove J, Little JB.** X-ray sensitivity of human tumor cells in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1980; 6:437-440
5. **Weichselbaum RR, Little JB.** Radioresistance in some human tumor cells conferred in vitro by repair of potentially lethal x-ray damage. Radiology 1982; 145:511-513
6. **Min WS, Song CW, Uckun FM.** Thermal sensitivity and thermal tolerance of human B-lineage acute lymphoblastic leukemia(ALL) cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1990; 18:147-153
7. **Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise, EP.** Mean inactivation dose : A useful concept for intercomparison of human cell survival curves. Radiat Res 1984; 99:73-84
8. **Malaise EP, Fertil B, Deschavanne PJ, Chavaudra N, Brock WA.** Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumor cells and fibroblasts. Radiat Res 1987; 111:319-333
9. **Puck TT, Marcus PL, Cieciura SJ.** Clonal growth of mammalian cells in vitro growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. J Exp Med 1956; 103:272-284
10. **Phillips RA, Tolmach LJ.** Anomalous X-ray survival kinetics in HeLa cell populations. Int J Radiat Biol 1964; 8:569-588
11. **Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A.** Introduction to radiobiology; Cellular effects of ionizing radiation on cell survival curves. 1st ed. London; Taylor & Francis, 1990: 86-125
12. **Deacon J, Peckham MJ, Steel GG.** The radiation responsiveness of human tumors and the initial slope of the cell-survival curve. Radiother Oncol 1984; 2:317-323
13. **Malaise EP, Fertil B, Chavaudra N, Guichard M.** Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: Comparison of in vitro to in vivo data. Int J Radiat Oncol Phys 1986; 12:617-624
14. **Fertil B, Malaise EP.** Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radio responsiveness of human tumors. Analysis of 101 published survival curves. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1985; 9:1699-1707
15. **Belli JA, Shelton M.** Potentially lethal damage: Repair by mammalian cells in culture. Science 1969; 165:490-492
16. **Teoule R.** Radiation-induced DNA damage and its repair. Int J Radiat Biol 1987; 51:573-589
17. **Iliakis G.** Radiation induced potentially lethal damage : DNA lesions susceptible to fixation. Int J Radiat Biol 1988; 53:541-584
18. **Weichselbaum RR, Nive J, Little JB.** Deficient recovery from potentially lethal radiation damage in ataxia telangiectasia and xeroderma pigmentosum. Nature 1978; 271:261-262
19. **Fertil B. Deschavanne PJ. Debieu D. Malaise EP.** Correlation between PLD repair capacity and the survival curve of human fibroblasts in exponential growth phase: Analysis in terms of several parameters. Radiat Res 1988; 116(1):74-88
20. **Little JB.** Repair of sublethal and potentially lethal radiation damage in plateau phase cultures of human cells. Nature 1969; 224:804-806
21. **Arlett CF, Priestley A.** Defective recovery from potentially lethal damage in some human fibroblast cell strains. Int J Radiot Biol 1983; 43:157-167
22. **Deschavanne PJ, Fertil B, Chavaudra N, et al.** The relationship between radiosensitivity and repair of potentially lethal damage in human tumor cell lines with implications for radioresponsiveness. Rdiat Res 1990; 122:29-37

= 국문 초록 =

인체 암세포주에서 방사선감수성의 지표간의 상호관계

충북대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 신경외과학교실*

박우윤 ·김원동 ·민경수*

목 적: 임상에서 발생빈도가 높은 위선암, 폐선암, 망막세포종, 자궁경부 편평상피암의 4가지 인체암세포주(MKN-45, PC-14, Y-79, HeLa)를 이용하여 방사선조사후 세포생존분획 및 세포생존곡선의 모양을 결정하는 지표를 구하고 방사선조사후 손상 회복정도를 측정하여 이들 여러 지표간의 상관관계 여부를 구명하기 위하여 본실험을 시행하였다.

대상 및 방법: 각 세포주의 방사선감수성을 보기 위하여 1, 2, 3, 5, 7 및 10Gy의 방사선을 1 회 조사하였고 방사선조사후 준치사손상 회복정도를 보기 위하여 5Gy씩 2회의 방사선조사를 0, 1, 2, 3, 4, 6 및 24시간 간격으로 시행하였다. 세포의 생존분획은 Sperman-K rber 방법으로 세포집락형성능력을 측정하여 산출하였으며 생존곡선의 수학적 분석은 linear-quadratic(LQ), multitarget-single hit(MS) 모형과 mean inactivation dose( )를 이용하였다.

결 과: 방사선조사후의 세포생존 실험결과 2Gy에서의 세포생존분획(SF2)은 0.174에서 0.85까지 다양하게 나타났으며 Y-79는 유의하게 낮은 SF2를, PC-14는 높은 SF2를 나타내었다 (p<0.05, t-test). LQ model로 분석한 방사선 세포생존곡선의 분석결과 Y-79, MKN-45, HeLa, PC-14에서 α가 각각 0.603, 0.356, 0.275, 0.102이었고 β는 각각 0.005, 0.016, 0.025, 0.027이었다. MS model로 분석한 결과는 Y-79, MKN-45, HeLa, PC-14에서 Do가 각각 1.59, 1.84, 1.88, 2.52였고 n은 0.97, 1.46, 1.52, 1.69를 보였다. 한편 Gauss-Laguerre방법으로 계산한 는 Y-79, MKN-45, HeLa, PC-14에서 각각 1.62, 2.37, 2.61, 3.95였다. SF2가 감소함에 따라 α값은 증가하였고 Do, 값은 감소하였으며 이들간의 Pearson 상관계수는 각각 -0.953, 0.993, 0.999였다 (p<0.05). 분할조사에 의한 준치사손상 회복정도는 약 4시간 내외에 포화상태에 도달하였으며 포화상태의 recovery ratio(RR)는 2에서 3.79 사이였다. RR은 방사선감수성의 지표인 SF2, α, β, Do, 과 통계학적으로 유의한 상관관계를 나타내지 않았다.

결 론: 본 연구의 결과 네가지 인체상피암세포주의 내재적 방사선감수성은 서로 상이하였으며 Y-79가 가장 민감하였고, MKN-45와 HeLa는 각각 중등도의 방사선감수성을 나타냈으며 PC-14는 방사선감수성이 가장 낮았다. 이와같은 감수성의 차이는 SF2, α, Do와 의 차이로 나타났으며 이들간에는 밀접한 상관관계를 나타내었다. 방사선에 의한 준치사손상 회복력은 MKN-45와 HeLa에서 높게 나타났고 회복력과 방사선감수성과는 무관하였다. 각 암세포주에 따르는 이와같은 지표들은 향후 방사선치료 효과를 높이기 위한 방사선생물학 실험의 기초 자료로서 이용되어 질 수 있을 것이다.