쥐 섬유육종에서 베타카로틴과 방사선조사 병용의 항종양 효과 : 세포독성 및 종양성장 지연에 미치는 영향

전북대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 의과학연구소†, 자연대학 생물과학부‡

권 형 철*† · 양 문 식‡

목 적 : 베타카로틴과 방사선조사의 병용효과에 관한 평가를 목적으로, 베타카로틴을 병용한 경우 방사선조사 단독의 경우 보다 세포독성의 차이는 어떠하며, 또한 쥐 섬유육종에서 두 군간의 종양성장의 지연 정도에 어떠한 차이가 있는가를 관찰하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법 : 2% 베타카로틴 유제를 2 mg/ml 으로 만든 다음 단계적으로 희석하여 사용하였으며, 섬유육종세포와 태생 5 6주의 C3H/N의 실험쥐를 이용하였다. 방사선조사는 6 MV 선형가속기를 이용하였고, 세포내 독성은 쥐 섬유육종세포의 생존을 감소시키는 능력으로 평가하였으며, 베타카로틴 2 mg/ml을 방사선조사 1시간 전 섬유육종세포주에 접촉시켰다. 종양성장 지연 실험을 위하여 베타카로틴과 방사선조사 병용군(n=6)과 방사선조사 단독군(n=5)으로 분류하였으며, 베타카로틴 20 mg/kg을 방사선조사 30분전 섬유육종이 접종된 쥐의 복강내 일회 주사하였고, 방사선조사량은 20 Gy를 주었다. 종양용적은 장경×장경×장경/2 (mm^3) 공식을 사용하였으며, 2 3일 마다 측정하였다.

결 과 : 섬유육종세포에 베타카로틴 0.002, 0.02, 0.2, 2 mg/ml 농도액을 1시간 동안 접촉 후 얻은 각각 생존분율은 0.69±0.07, 0.59±0.08, 0.08±0.008 및 0.02±0.006이었다. 그리고 방사선조사 1시간 전 섬유육종세포에 베타카로틴 2 mg/ml을 접촉한 후 조사량 2, 4, 6 및 8 Gy에서 얻은 각각의 생존분율은 0.13±0.05, 0.03±0.005, 0.01±0.002 및 0.009±0.0008이었으며 방사선조사 단독군의 경우 동일 조사량에서 얻은 생존분율은 각각 0.66±0.05, 0.40±0.04, 0.11±0.01 및 0.03±0.006으로 나타났다($p<0.05$). 종양성장의 지연정도를 나타내는 실험에서 섬유육종을 쥐에 접종한 후 종양의 용적이 1,000 mm^3 에 달하는 기간은 베타카로틴 병용군과 방사선조사 단독군에서 각각 18일과 19일로 나타났다($p>0.05$).

결 론 : 쥐 섬유육종세포에 베타카로틴을 접촉한 경우 세포독성이 나타났으며, 베타카로틴 농도 증가에 따라 세포독성도 증가하였다. 그리고 쥐 섬유육종세포의 세포독성은 베타카로틴 병용군에서 방사선조사 단독군의 경우 보다 부가적으로 증가하였으며, 두 군간에 통계학적으로 현저한 차이를 보였다. 그러나 쥐 섬유육종 성장 지연정도에 있어서 베타카로틴 병용군과 방사선조사 단독군간의 통계학적으로 뚜렷한 차이는 없었다.

핵심용어 : 베타카로틴, 세포독성, 종양성장 지연, 방사선조사

서 론

현대의학의 암 치료에서 방사선치료는 수술 및 항암 화학요법과 더불어 암 환자의 생존율을 증가 시키는데 큰 역할을 해왔다. 그러나 방사선생물학적 관점에서 볼 때 저 산소를 함유한 종양의 경우 방사선반응이 감소되어 재발의 우려가 높거나, 아예 방사선감수성이 낮은 종양의 경우 치료반응이 낮을 수 있어 이러한 문제를 극복해야 한다고 본다. 이러한 배경[1-5]으로 볼 때 세포독성은 크면서 반대로 합병증이 적은 방사선 반응 조절약물의 신약 개발이 필요하나 아직 기술 축적이나 자본이 열악한 국내 여건상 어려움이 있는 실정이다. 따라서 오랜 시간과 많은 비용이 드는 신약개발과 별도로 이미 개발된 약물이나 보조 식품을 이용한 방사선 반응의 증강 또은 보호 작용에 관한 연구는 시간과 비용 절약 차원에 있어서 유용성이 높다고 본다.

베타카로틴은 주로 과일이나 채소에 포함되어 있는 pro-vitamin A로서 발암을 억제하는 여러가지 영양소 중의 하나로 주목받고 있으며, 과잉 섭취했을 때도 간에 저장되지 않고 지방조직에 저장되어 독성이 나타나지 않는 장점이 있

본 연구는 '1995 산학연공동연구개발 과제별 사업비'와 '1997년도 전북대학교병원 임상연구비'의 일부 보조로 이루어졌음
이 논문은 1999년 12월 16일 접수하여 2000년 3월 31일 채택되었음.

책임저자 : 권형철, 전북대학교 의과대학 치료방사선과학교실
Tel : 0652)250-1195, Fax : 0652)250-1192
E-mail : hckwon@moak.chonbuk.ac.kr

다.[6, 7] 베타카로틴을 이용한 현재까지의 연구는 주로 암의 화학적 예방효과에 관한 임상시도[8, 9]와, 방사선 방어작용에 관한 분야[10, 11]에 국한되어 이루어졌다. 그러나 상기 연구분야와는 달리 방사선조사시 베타카로틴을 병용할 경우 마우스 종양크기가 방사선조사 단독보다 더욱 억제되고 생존기간도 연장을 가져왔다는 실험적 연구결과가 발표되었다[12]. 베타카로틴을 병용하여 방사선반응을 증강시킨 이러한 연구결과는 종전 연구 결과들에 비해 매우 생소하다. 따라서 이를 규명하기 위한 실험 연구가 필요하다고 본다.

본 연구는 베타카로틴을 방사선조사에 병용한 경우 쥐 섬유육종세포의 세포독성과 섬유육종의 성장 지연에 미치는 영향을 알아보고자 시도하였다.

대상 및 방법

천연산 베타카로틴(Betatene Ltd., Australia) 2% 유제를 RPMI 1640 배지액과 혼합하여 2 mg/ml를 만든 후 이를 희석하여 각각 0.2, 0.02, 0.002 mg/ml의 농도를 얻어 시료로 사용하였다. 암 세포주는 생명공학 연구소(대덕, 대전)에서 분양받은 태생 5 6주의 C3H/N 쥐를 통해 얻은 섬유육종세포(FSaII)를 사용하였다. X-선 조사는 6 MV 에너지의 선형가속기(Siemens Co., Germany)를 사용하였으며, 방사선 발생원부터 100cm 거리에 배양플라스크 또는 실험쥐 조사를 위하여 제작한 원형의 아크릴 상자를 놓고 조사하였다. 사용된 방사선 조사량은 2, 4, 6, 8 Gy이었다.

베타카로틴의 세포독성 정도를 알아보기 위하여 clonogenic assay법을 이용하였다. 200 2,000개의 쥐 섬유육종세포를 10% 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지액에 24 36시간 정도 배양하여 지수성장에 도달하게 한 다음, 0.002, 0.02, 0.2 및 2 mg/ml의 베타카로틴 시료를 각각 배양플라스크의 바닥에서 자라고 있는 섬유육종세포주에 1시간 동안 접촉시켰다. 이후 RPMI 1640 배지로 세척하여 일주일 정도 세포배양기(37℃, 5% CO_2)에서 배양하였으며, 생성된 콜로니를 알코올로 고정한 뒤 crystal violet 으로 염색하여 콜로니 수를 계산하였다. 그리고 이를 토대로 베타카로틴의 농도에 따른 생존분율을 구하였다. 또한 베타카로틴 및 방사선조사 병용군과 방사선조사 단독군 사이의 세포독성 정도를 비교하기 위하여 clonogenic assay법을 이용하였다. 방사선조사 단독군의 경우 쥐 섬유육종세포에 2, 4, 6, 8 Gy를 조사하였고, 병용군의 경우 베타카로틴 2 mg/ml 농도 2 ml를 RPMI 1640 배지액을 함유한 배양플라스크의 쥐 섬유육종세포에 1시간 접촉시킨 다음, 동일한 방사선조사량을 조사하고 상기와 같은 방법으로 각각 생존분율을 구하였다. 세포독성 실험은 3회 반복하였다.

베타카로틴 및 방사선과 병용군과 방사선조사 단독군 사이에 실험쥐 섬유육종의 성장크기에 미치는 영향을 비교하기 위한 종양성장 지연 실험을 위하여 베타카로틴 및 방사선조사 병용군(n=6)과 방사선조사 단독군(n=5)으로 분류하였다. C3H/N 쥐에서 섬유육종을 유도하기 위하여 2×10^5개의 섬유육종 세포를 우측 허벅지에 피하 접종하였으며, 약 11일째 종양의 직경이 8 10 mm 정도에 이르러 종양 용적의 측정이 가능하였다. 베타카로틴 병용군의 경우 20 mg/kg 농도의 베타카로틴 0.2 ml를 방사선조사 30분전, 직경이 8 10 mm정도에 이른 C3H/N 쥐에 복강내 일회 주사하였으며, 두 군의 C3H/N 쥐에 각각 주어진 방사선조사량은 20 Gy이었다. 종양용적은 방사선조사 후 2 3일 마다 공구제도용 자를 이용하여 단경과 장경을 측정한 다음 장경×장경×장경/2 (mm^3) 공식을 사용하여 구하였다. 그리고 두 군간의 종양 성장의 지연정도를 비교하기 위하여 종양세포 접종 후 1,000 mm^3에 달하는 기간을 사용하였다. 그리고 두 군간의 세포독성과 종양성장 지연의 차이에 관한 통계학적 검정은 t-test를 사용하였다.

결 과

1. 시험관내 세포독성

1) 베타카로틴 농도에 따른 세포독성

쥐 섬유육종세포에 베타카로틴 0.002, 0.02, 0.2, 2 mg/ml 농도액을 1시간 동안 접촉시킨 후 얻은 생존분율은 각각 0.69±0.07, 0.59±0.08, 0.08±0.008 및 0.02±0.006으로 나타났다(Fig. 1).

2) 베타카로틴 및 방사선조사 병용군과 방사선조사 단독군의 세포독성

쥐 섬유육종세포에 베타카로틴 2 mg/ml 농도 2 ml를 1시간 동안 접촉시킨 다음, 병용 목적으로 방사선조사량 2, 4, 6, 8 Gy를 주었을 때 얻은 생존분율은 각각 0.13±0.05, 0.03±0.005, 0.01±0.002, 0.009±0.0008 이었으며, 방사선조사 단독군의 경우 동일조사량에서 얻은 생존분율은 각각 0.66±0.05, 0.40±0.04, 0.11±0.01 및 0.03±0.006으로 나타났다($p<0.05$) (Fig. 2).

2. 쥐 섬유육종의 성장 지연

쥐 섬유육종세포를 접종한 후 종양의 용적이 1,000 mm^3에 달하는 기간은 베타카로틴 및 방사선조사 병용군과 방사선조사 단독군에서 각각 19일과 18일로 나타났다($p>0.05$) (Fig. 3).

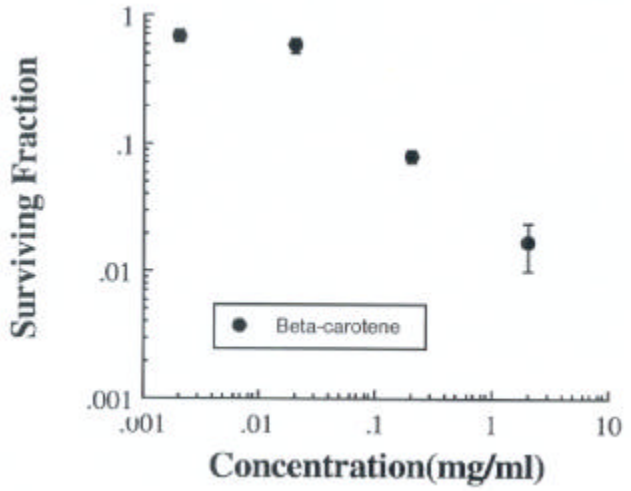

Fig. 1. Survival fraction of FSaII cell at beta-carotene concentration of 0.002, 0.02, 0.2 and 2 mg/ml. Beta-carotene was contated to FSaII cells for 1 hour.

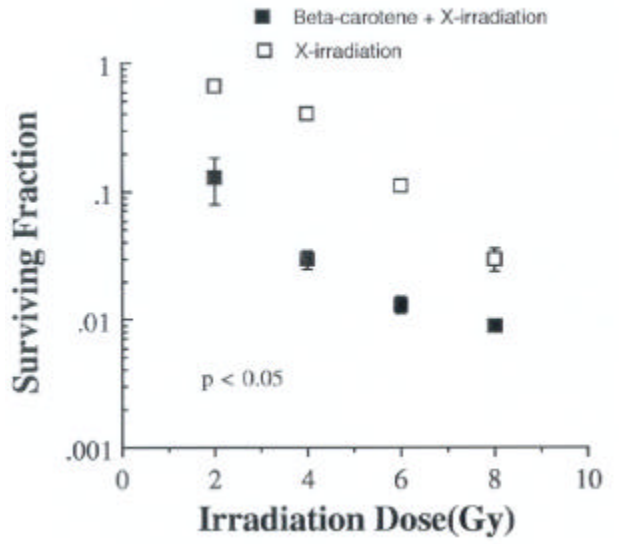

Fig. 2. Survival fraction of FSaII cell at X-irradiation of 2, 4, 6, 8 Gy. 2 mg/ml of beta-carotene was contacted to FSaII cell for 1 hour before X-irradiation in the beta-caroten + X-irradiation group.

고 안

베타카로틴은 비타민 A 전구체 물질로서 비타민 C, E와 더불어 방사선 방어 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 암 발생에 화학적 예방 역할을 하는 것으로 기대되어 그동안 많은 임상시도가 있어 왔다.[1, 13] 그러나 이와 달리 미국 예시바 대학의 Seifter 등[12]은 1984년도 비타민, 영양 및 암이

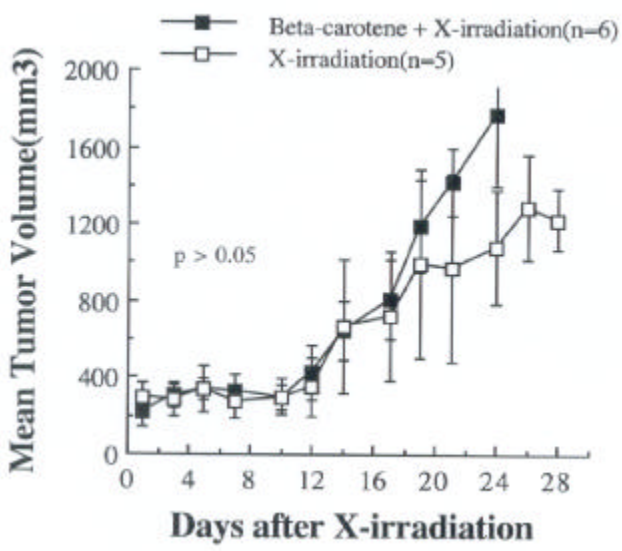

Fig. 3. Growth delay of FSaII which show mean tumor volume(mm^3) as a function of days after tumor inoculation. The fibrosarcoma bearing mice were injected i.p. with 0.2 ml of 20 mg/kg of beta-carotene 30 minute before X-irradiation.

란 잡지에 발표한 결과에서, C3HBA 종양을 이식한 CBA/J 실험쥐에 국소적 방사선조사와 비타민 A 또는 베타카로틴과 병용으로 사용하였는데 베타카로틴과 방사선조사 병용그룹이 방사선조사 단독군에서 보다 종양 크기의 억제력이 현저하였고, 생존기간도 동 그룹에서 수명이 더욱 연장되었으며, 또한 이러한 결과는 비타민 A 및 방사선조사 병용군에서 보다 베타카로틴 과 방사선조사 병용군에서 방사선조사 단독군 보다 차이를 나타냈다고 보고하였다.[12] 또한 Schwartz 등[14]도 베타카로틴을 이용한 실험에서 햄스터에 접종한 암의 크기가 줄어들었다고 보고하였는데 이에 관해서 시사하는 바가 크다고 본다. 현재까지 베타카로틴의 주 작용이 방사선 방어와 암의 화학적 예방에 있는 것으로 알려져 있어 이러한 결과는 방사선종양 의사들 한테는 매우 생소하다고 본다.

오늘날 기존의 항암화학 약물이나 방사선반응 조절약물 등은 대개 신경독성 또는 골수기능 저하 등의 합병증을 초래하여 암치료에 제약을 주고 있는 실정이며, 그나마 국내에서는 이와 관련된 신약은 미 개발상태이다. 이러한 배경에서 베타카로틴 같이 섭취할 경우 지방조직에 흡수되어 독성이 거의 없는 약물들이 방사선반응을 증강시킬 수 있다고 실험연구는 매우 의미가 있을 수 있다고 본다.

연구자들은 Seifter 등[12]과 달리 베타카로틴의 시험관내 세포독성 연구를 시도하였으며, 이 결과에서 천연 베타카로틴 2 mg/ml 농도를 실험쥐 섬유육종세포에 1시간 동안 접촉하여 0.02의 생존분율을 얻었다. 다시말해서 동일 농도의 베타

카로틴이 약 98%의 섬유육종세포에 손상을 준 셈이다. 이러한 결과는 베타카로틴이 방사선조사에 세포보호 작용이 있다고 알려진 점으로 보아 매우 생소하며, 이의 규명을 위한 실험연구가 더욱 필요하다고 본다. 그리고 섬유육종세포에 베타카로틴 2 mg/ml 농도 2 ml를 1시간 동안 접촉시킨 후 얻은 세포독성은 2 8 Gy의 방사선조사량 전 범위에서 베타카로틴 및 방사선조사 병용군이 방사선조사 단독군 보다 약 10배 정도 균등하게 증가된 점으로 보아 베타카로틴의 병용효과가 방사선조사의 세포독성을 직접 증가시켰거나 감소시키지는 않았으며 단순히 베타카로틴의 세포독성 효과와 방사선조사의 세포독성이 부가적으로 작용하여 방사선조사 단독군 보다 세포독성이 증가한 것으로 추정된다. 그러나 C3H/N 실험쥐실험쥐에 섬유육종세포를 접종하여 종양을 이용한 성장지연의 실험에서 방사선조사 직전 천연베타카로틴 20 mg/kg 농도 0.2 ml를 일회 복강내 조사한 병용군이 방사선조사 단독군 보다 종양 성장의 지연정도나 생존기간에 있어서 차이를 나타내지 못하였다. 이에반해 Seifer 등[12]은 베타카로틴을 음식형태로 제조하여 선암이 접종된 실험쥐에 경구적으로 섭취시킨 후 방사선조사시 방사선조사 단독의 경우 보다 종양의 크기가 감소하였고 또한 생존기간이 증가하였다고 보고하였다. 이는 연구자들의 결과와는 차이가 있는데 우선 실험 방법에서의 주요 차이점은 베타카로틴의 섭취방법과 용량을 들 수 있다고 본다. Seifer 등[12]은 베타카로틴 90 mg/kg을 먹이 형태로 제조하여 경구적으로 섭취시켰는데 반해 연구자들은 천연베타카로틴 20 mg/kg 농도액을 시료로 만들어 실험쥐의 복강내 일회 주사 방식으로 하였다. 연구자들이 복강내 주사 방식을 택한 이유는 사실상 국내에서 원하는 용량의 베타카로틴이 함유된 실험쥐 먹이를 제조하는 것이 어려웠기 때문이었다. 따라서 연구자들은 이를 대체하기 위하여 베타카로틴 2 mg/ml을 실험쥐의 체중으로 환산하여 20 mg/kg 농도액을 산출한 후 이를 복강내 조사하였다. 연구자들의 종양지연 실험 결과에서 베타카로틴 병용군이 방사선조사 단독군 보다 차이를 나타내지 못한 이유가 이러한 베타카로틴의 투여 경로 또는 용량 문제인가는 앞으로 규명할 문제라고 본다.

감사의 글

본 연구 추진에 도움을 준 (유)한풍제약과 논문 결과의 통계학적 검증에 도움을 준 전북대학교 의과대학 염정호 조교수에 감사를 드린다.

참 고 문 헌

1. **Wasserman TH, Chapman JD, Coleman CN.** Chemical modifiers of radiation. In : Perez CA, Brady LW. Principles and Practice of Radiation Oncology. 3rd ed. Philadelphia, PA : Lippincott Co. 1998:685-704.
2. **Brown JM.** Keynote address : Hypoxic cell radiosensitizers: Where next? Int J Radiation Oncol Biol Phys 1989; 16:987-993
3. **Kwon HC, Lyons JC, Song CW.** Radiosensitization of hypoxic cells in vitro and in vivo by AK-2123. The Journal of JASTRO 1991; 3:125-131
4. **Song CW, Hasegawa Takeo, Kwon HC, Lyons JC, Levitt SH.** Increase in Tumor Oxygenation and Radiosensitivity Caused by Pentoxifylline. Radiat Res 1992; 130:205-210
5. **Kim SH, Khil MS, Ryu S.** Enhancement of radiation response on human carcinoma cells in culture by pentoxifylline. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1993; 25:61-65
6. **Mayne ST, Lippman SM.** Cancer prevention: Chemopreventive agents. In: Devita VT, Hellman S, Rosenverg SA. Cancer; Principles & Practice of Oncology. 5th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Co. 1997:585-617
7. **Blot WJ, LI J-Y, Taylor PR.** Nutrition intervention trials in Linxian. China: supplementation with specific vitamin/mineral combination, cancer incidence, and disease specific mortality in the general population. J Natl Cancer Inst 1993; 85:1492
8. **The Alpha-Tocopherol, β Carotene Cancer Prevention Study Group.** The effect of vitamein E and β carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N Eng J Med 1994; 330:1029
9. **Hong WK, Lippman SM, Itri LM.** Prevention of secondary primary tumors with 13cRA in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Eng J Med 1990; 323:795
10. **Ben-Amotz A, Yatziv S, Sela M.** Effect of natural beta-carotene supplementation in children exposed to radiation from the Chernobyl accident. Radiat Environ Biophys 1998; 37:187-193
11. **Ben-Amotz A, Rachmilevich B, Greenberg S.** Natural beta-carotene and whole body irradiation in rats. Radiat Environ Biophys 1996; 35:285-288
12. **Seifter E, Rettura G, Padawer J.** Vitamin A and Beta-Carotene as Adjunctive Therapy to Tumor Excision, Radiation Therapy, and Chemotherapy. In : Prasas KN, eds. Vitamins, Nutrition, and Cancer. 1st ed. Denver, Colo. : Karger Co. 1984: 1-19
13. **Mayne ST, Lippman SM.** Cancer Prevention: Chemopreventive Agents. In : Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer : Principles & Practice of Oncology. 5th ed. Philadelphia & Newyork, PA & NY : Lippincott-Raven Co. 1997:585-599
14. **Schwartz J, Shklar G.** Regression of experimental hamster cancer by beta-carotene algae extracts. J Oral Maxillofac Surg 1987; 45:510

Abstract

Anti-tumor Effect of Combined Betacarotene with X-irradiation in the Mouse Fibrosarcoma : Cytotoxicity and Tumor Growth Delay

Hyoung-Cheol Kwon, M.D.[*,†] and Moon-Sik Yang, Ph.D.[‡]

[*]Department of Therapeutic Radiology and Oncology and [†]Institute for Medical Sciences, Medical School, [‡]Division of Biological Science, College of Natural Sciences, Chon-buk National University, Chon-ju, Korea

Purpose : To investigate whether combined beta-carotene with X-irradiation has more enhanced radition response than X-irradiation or not, we performed a experiment about *in vitro* cytotoxicity of beta-carotene and/or X-irradiation in the fibrosarcoma cells, tumor growth delay of combined beta-caroten with/or X-irradiation in the mouse fibrosarcoma.

Materials and Methods : 2% emulsion of beta-carotene was serially diluted and used. X-irradiation was given by 6 MeV linear accelerator. The cytotoxicity of beta-carotene in vitro was evaluated from clonogenic assay. To compare the cytotoxicity between combined beta-carotene with X-irradiation and X-irradiation group, 2 mg/ml of beta-carotene was contacted to fibrosarcoma (FSaII) cells for 1 hour before X-irradiation. For the tumor growth delay, single 20 Gy was given to FSaII tumor bearing C3H/N mice whic was classified as beta-crotene with X-irradiation group (n=6) and X-irradiation alone group (n=5). 0.2 ml of 20 mg/kg of beta-carotene were i.p. injected to mice 30 minute before X-irradiation in the beta-crotene with X-irradiation group. The tumor growth delay defined as the time which reach to 1,000 mm^3 of tumor volume.

Result : (1) Cytotoxicity *in vitro*; 1) survival fraction at beta-carotene concentration of 0.002, 0.02, 0.2 and 2 mg/ml were 0.69±0.07, 0.59±0.08, 0.08±0.008 and 0.02±0.006, respectively. 2) each survival fraction at 2, 4, 6 and 8 Gy in the 2 mg/ml of beta-carotene + X-irradiation group were 0.13±0.05, 0.03±0.005, 0.01±0.002 and 0.009±0.0008, respectively. But each survival fraction at same irradiation dose in the X-irradiation group were 0.66±0.05, 0.40±0.04, 0.11±0.01 and 0.03±0.006, respectively($p<0.05$). (2) The time which reach to 1,000 mm^3 of tumor volume of beta-carotene + X-irradiation group and X-irradiation alone group were 18, 19 days, respectively($p>0.05$).

Conclusion : The contact of beta-caroten to FSaII cells showed mild cytotoxicity which was increased according to concentration. The cytotoxicity of combined beta-carotene with X-irradiation more increased than that of X-irradiation, additionaly. And there was significant difference of cytotoxicity between two groups. But there were no significant difference of the growth delay of fibrosarcoma between two groups.

Key Words : Beta-carotene, Cytotoxicity, Tumor growth delay, X-irradiation