

선택적 COX-2 억제제 NS 398과 EGF 수용체 차단제 AG 1478의 복합투여가 HeLa 세포주의 방사선 감수성에 미치는 영향

을지의과대학교 방사선종양학교실*, 해부병리학교실†, 경상대학교 의과대학 방사선종양학교실‡

윤선민* · 오영기* · 김주현† · 박미자† · 성인옥† · 강기문‡ · 채규영‡

목적: 분자 표적의 선택적 억제제가 방사선 세포 살상 효과를 증진시키는 것으로 알려져 있으므로 선택적 COX-2 억제제와 EGF 수용체 차단제를 HeLa 세포주에 처리한 후 방사선 효과의 상승작용을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에서 EGF 수용체 차단제 AG 1478, 선택적 COX-2 억제제 NS 398 과 방사선을 복합 투여하여 세포성장 억제 분석(cell growth inhibition assay)과 세포사멸 분석(apoptosis assay)을 시행하였고, 방사선 감수성 변화를 살펴보기 위해 세포생존 분석(clonogenic survival assay)을 시행하였다. 방사선 감수성 인자로는 2 Gy에서의 세포생존분획(SF₂)과 linear-quadratic model을 이용한 dose enhancement ratio (DER)를 사용하였다. 방사선 감수성에 대한 작용기전 분석을 위해 flow cytometry로 세포주기 분석(cell cycle analysis)을 시행하였고, western blot 분석을 통하여 bcl-2와 bax 단백질의 발현 변화를 살펴보았다.

결과: HeLa 세포에 NS 398과 AG 1478을 방사선과 함께 복합 투여한 실험 군에서 세포사멸 정도가 가장 높게 나타났다(8.49% vs. 22.70%). 세포주기 분석 결과, 방사선과 복합 약물 처리군에서 G₀/G₁ 세포주기 정체와 S 세포 분획 소실이 나타났으며 이러한 변화는 72시간 이후까지 지속되었다. 세포생존 분석 결과로는 방사선과 AG 1478군에서 SF₂ 0.68±0.07, DER 1.12를 보인 반면, 방사선과 복합약물처리군에서는 SF₂ 0.12±0.01, DER 3.00으로 나타났다. Western blot 분석에서는 방사선과 복합약물처리군에서 bcl-2와 bax 단백질 발현이 모두 감소하는 양상을 보였다.

결론: 신호전달 체계를 억제하는 분자 표적 약제인 선택적 COX-2 억제제와 EGF 수용체 차단제를 방사선과 복합 투여함으로써 HeLa세포의 방사선 감수성이 증가됨을 확인하였다.

핵심어: 선택적 COX-2 억제제, EGF 수용체 차단제, 방사선, HeLa 세포주

서 론

최근 분자 생물학의 발전으로 종양 변형과 진행과정에 관여하는 중요한 매개 분자들이 규명되었고 이러한 분자 표적이나 신호전달경로(signal transduction pathway)에 관여하는 약물이 개발되었다.¹⁾ 암세포의 성장, 분화 및 생존에 관련되는 것으로 주목받는 중요한 매개 효소들은 tyrosine kinase, protein kinase (PKC) 및 farnesyl transferase 등이 있다.²⁾ 분자표적 치료에 사용되는 약물은 암세포 신호전달경

로, 혈관신생(angiogenesis), 세포간질(matrix), 세포주기 조절인자(cell cycle regulator), 세포사멸(apoptosis) 등 다양한 표적에 작용한다.³⁾ 이러한 분자표적 약물은 세포의 신호전달 경로를 교란시켜 암세포 증식에 중요한 영향을 미친다. 또한 분자표적 약물들은 각종 암의 특이한 분자표적만을 선택적으로 억제시켜 암 세포 내의 신호전달 경로를 차단하므로 기존의 항암제와는 구별된다. 현재 이러한 효소들의 활성을 억제하는 다양한 약제들이 개발되어 사용되고 있다. Tyrosine kinase를 억제하는 대표적인 약물로는 imatinib (STI571, Glivec[®])이 있고, trastuzumab (Herceptin[®]), C 225 (Cetuximab[®])와 ZD 1839(Iressa[®]) 등은 epidermal growth factor (EGF) 수용체를 억제한다.³⁻⁵⁾ 분자표적 약물은 생체 내 실험과 동종이식 동물실험을 거쳐 현재 제2~3상 임상 시험이 진행되고 있고 유방암, 폐암, 두경부암 등에 단독으로 사용되거나 기존에 사용하던 항암제 및 방사선 치료와

이 논문은 2005년 2월 7일 접수하여 2005년 2월 15일 채택되었음.
본 논문은 2004년도 을지의과대학교 학술조성연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

책임저자: 채규영, 경상대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 055)750-8220, Fax: 055)750-8217
E-mail: cgyinj@nongae.gsnu.ac.kr

병합하여 사용되고 있다.⁴⁻⁶ 또 기존의 치료에 더 이상 반응하지 않는 불응성 암 환자에서 분자표적 약물은 기존의 항암제 및 방사선 치료의 효과를 증가시켜 줄 수 있다고 알려져 있다.⁷ EGF 수용체에 대한 단클론항체인 C 225 (Cetuximab[®])는 항암제나 방사선과 병용하였을 때 현저한 상승효과를 보였으며, 이를 토대로 EGF를 발현하는 각 종 암에서 임상시험이 이루어졌다.⁶⁻⁹ 특히 진행된 두경부암 환자를 대상으로 하는 제3상 임상 시험에서 방사선 단독 치료에 비해 C 225를 병용 투여한 경우 국소 제어율과 무병 생존율이 증가하는 것으로 보고되었다.¹⁰ ZD 1839는 EGF 수용체를 억제하는 효과를 나타내는 대표적인 약물로써 전 임상연구에서 우수한 항암효과와 경구 흡수율을 보였으며¹¹ 항암제를 투여한 비소세포 폐암 환자를 대상으로 하는 제1상 임상시험에서 단독 투여하였을 때 19%의 반응을 보였다.¹²

많은 암세포에서 cyclooxygenase-2 (COX-2) 효소가 과 발현되어 있으며,¹³ 이 효소는 종양의 성장과 혈관신생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고¹⁴⁻¹⁶ 선택적 COX-2 억제제는 항암 약물 치료 또는 방사선 치료와 병행하였을 때 치료 효과가 증대된다고 보고되고 있다.^{16,17} 선택적 COX-2 억제제의 항암 작용기전은 명확하게 밝혀지지 않았으나 몇 가지 가능성이 제시되어 있다. 즉, 신생 혈관 생성의 억제, 세포주기 조절, 프로스타그란딘(prostaglandin)에 의한 면역체계 감소 억제, 그리고 세포사멸 유도에 의해 항암 작용을 일으키는 것으로 추정된다. 선택적 COX-2 억제제의 방사선 감수성 증가에 대한 연구는 동물 실험과 암 환자를 대상으로 이미 진행되었으며¹³⁻¹⁷ 특히 COX-2가 과 발현된 암 환자에서 방사선 조사에 대한 감수성 증진 효과가 높은 것으로 알려져 있다.^{17,18}

항암제 투여 시 대개의 경우 단일 약제 투여보다는 복합 투여, 특히 작용기전이 상이한 항암제들의 복합투여가 훨씬 효과적인 경우가 많다. 이러한 맥락에서 보면 앞에서 열거한 여러 종류의 분자표적 약제에 있어서도 단독투여 보다는 복합투여가 더욱 효과적일 수 있다. Cataldo 등⁹은 인간 대장암 세포주와 난소암 세포주에서 EGF 수용체 억제제인 C 225를 type I protein kinase antisense oligonucleotide와 함께 투여하고, 동시에 방사선을 조사함으로써 방사선 치료 효과가 증대된다고 보고하였고, 생체 내 실험을 통해 암세포 성장이 효과적으로 지연되었음을 확인하였다. 또 Matar 등⁸은 EGF 수용체 발현이 높은 종양에서 ZD 1839와 Cetuximab의 병용 효과를 생체 내 실험과 동물실험에서 연구한 결과 두 약제의 병용이 단독 사용보다 월등한 상승효과를 보인다고 발표하였다. 암세포에는 다양한 신호

Table 1. Experimental Groups according to the Treatment

Groups	Treatment
Group 1	Radiation only
Group 2	Radiation+AG 1478
Group 3	Radiation+NS 398
Group 4	Radiation+AG 1478+NS 398

전달경로가 공존한다고 알려져 있으므로 이를 동시에 치료 표적으로 삼으려면 표적 약물을 복수로 사용할 필요성이 있다. 따라서 부작용이 상대적으로 적은 두 가지 이상의 분자표적 약물을 기존의 방사선 치료 또는 항암 약물 치료와 병행하여 효과를 극대화시킬 수 있는 치료 방법이 필요하다.

본 연구에서는 방사선 치료 효과를 증가시킬 수 있는 방법으로 EGF 수용체 차단제와 선택적 COX-2 억제제 두 가지 약물을 방사선 조사와 복합병용한 후, 세포성장 억제 (cell growth inhibition), 세포생존(cell survival), 세포사멸 (apoptosis), 세포주기(cell cycle) 등을 분석하여 한 종류의 약물과 방사선을 단독병용한 경우와 비교하여 방사선 감수성이 얼마나 증가되는지를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료

인간 자궁경부의 선암 세포주인 HeLa 세포는 American type culture collection (ATCC, USA)에서 분양받아 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA)과 penicillin (100 units/ml), streptomycin (100µg/ml) (Gibco BRL, USA)이 포함된 RPMI 1640 (JBI, Korea) 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂가 공급된 조건에서 배양하였다. EGF 수용체 차단제 AG 1478 (Calbiochem, Germany)과 선택적 COX-2의 선택적 억제제 NS 398 (Calbiochem, Germany)은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 원액에 녹여서 농축용액으로 조제하였다.

2. 실험방법

1) 세포약물처리 및 방사선 조사(Drug treatment and irradiation)

세포를 방사선 단독처리군(1군), 방사선과 NS 398 복합처리군(2군), 방사선과 AG 1478 복합처리군(3군), 그리고 방사선과 NS 398, AG 1478 복합처리군(4군)으로 분류하여 실험을 진행하였다(Table 1). 60 mm 세포 배양기(Falcon)에 1×10⁵ 세포의 비율로 준비하여 10회 이하로 계대 배양하

였다. 실험에 사용된 세포는 90% 이하 융합된 배양세포만을 사용하였다. 24시간 배양된 세포에 AG 1478을 각각 1, 10, 20 μ M, NS 398을 각각 10, 50, 100 μ M의 농도로 3시간 동안 약물처리하고 6MV 선형가속기(Synergy, Elekta)를 이용하여 200~300 cGy/min의 선량률로 상온에서 단계별(0, 2, 5, 9 Gy) 조사하였다. 24시간 추가 배양 후 phosphate buffered saline (PBS)로 세척 후 약물이 첨가되지 않는 배양액으로 교체하였다. 배양액 교체 후 24, 48, 72시간 간격으로 배양하였고 실험목적에 따라 0.5% 트립신을 처리하여 HeLa 세포를 회수하였다. 대조군은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 처리 후 실험군과 같은 시간 동안 배양하였다.

2) 세포성장 억제 분석(Cell growth inhibition assay)

HeLa 세포에서 각 약물에 대한 세포독성 실험을 시행하여 AG 1478과 NS 398에 대한 IC₅₀ 값(50% 성장저해 유발 농도)을 구하였다.¹⁹⁾ AG 1478과 NS 398을 세포에 처리한 후 5시간 동안 배양하였고, 약물 처리하지 않은 세포 배양 농도에 비해 세포 밀도가 50% 감소하는 약물의 농도를 IC₅₀ 값으로 정하였다. AG 1478 IC₅₀ 값은 100 μ M이었고, NS 398은 200 μ M이었다. 세포성장 억제 실험을 하기 위해 1 \times 10³개의 세포를 60 mm 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 24시간 후, 각각 0, 2, 5, 9 Gy로 방사선 조사를 한 후 AG 1478은 10 μ M 농도로 약물 처리하였고, NS 398은 50 μ M 농도로 처리하여 24, 48, 72시간 동안 관찰하였다.

3) 세포주기 분석(Cell cycle analysis)

세포주기를 분석하기 위해서 propidium iodide (PI)를 이용하여 DNA의 양을 분석하였다. HeLa 세포를 회수하여 PBS로 세척한 후 5% FBS를 포함한 PBS 500 μ l에 부유시킨 다음 75% ice-cold ethanol 1 ml을 첨가하여 4°C에서 10분간 고정하였다. 세포를 염색 직전에 원심 분리하여 ethanol을 제거한 후 PI 염색액(100 μ l/ml Rnase A, 10 μ l/ml PI를 함유한 PBS)으로 부유시키고 실온 암소에서 30분간 방치한 다음 Coulter Epics XL Flow cytometry system (Beckman Coulter)으로 분석하였다.

4) 세포생존 분석(Cell survival assay)

세포생존 분획(cell survival fraction, SF) 분석은 12일 동안 배양액 교체 없이 유지시키고 이후에 세포증식을 관찰하였다. 집락수는 0.5% crystal violet (Sigma Chemical Co.)으로 고정 염색하여 적어도 50개 이상의 종양세포로 이루어진 집락수를 세었다. SF는 계수한 평균 집락수를 분주한 세포수와 plating efficiency의 곱으로 나눈 값으로 구하였고, plating efficiency는 대조군의 분주한 세포수에 대한 대

조군의 생성된 집락수의 비에 의해 구했다. 세포생존 곡선 자료를 얻기 위한 linear quadratic model을 구하기 위해 다음과 같은 공식을 이용하였다.

$$\ln(SF) = -\alpha D - \beta D^2 \quad (D: \text{radiation dose, } \alpha, \beta: \text{상수})$$

$$\text{Survival Fraction} = \frac{\text{계수한 평균 집락수}}{\text{분주한 세포수} \times \text{Plating efficiency}}$$

$$\text{Plating efficiency} = \frac{\text{대조군의 평균 집락수}}{\text{대조군의 분주한 세포수}}$$

모든 실험군의 SF는 대조군의 SF로 나누어서 정규화하였다. 방사선 민감도를 측정하기 위한 변수로써 본 실험에서는 SF₂ (2 Gy에서 세포생존 분획)와 dose enhancement ratio (DER)를 이용하였다. DER은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DER} = \text{SF}_{0.25} \text{에 대응하는} \frac{(\text{방사선+DMSO 실험군}) \text{ 방사선량(Gy)}}{(\text{방사선+약물처리군}) \text{ 방사선량(Gy)}}$$

5) 세포사멸 분석(Apoptosis assay)

세포사멸 정도의 차이를 살펴보기 위하여 annexin-V binding method를 통해 확인하였다. 세포사멸은 세포막을 싸고 있는 외벽에 노출된 phosphatidylserine과 annexin-v가 결합하는 것을 측정하여 확인하였다. 세포 괴사는 phosphatidylserine이 PI에 염색되는 것으로 세포사멸과 구분하였다. 배양된 HeLa 세포는 trypsin-EDTA solution (0.5% trypsin, 5.3 mM EDTA)으로 처리하고 PBS로 세척한 다음 annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Bioscience)를 사용하여 염색하였다. HeLa 세포를 100 μ l binding buffer (10 mM Hepes/NaOH (pH 7.4) 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂)에 부유시키고 annexin V-FITC (buffer: 50 mM Tris (pH 8.0), 80 mM NaCl, 2.0% BSA, 1 mM EDTA, 0.09% sodium azide) 5 μ l와 PI staining solution 5 μ l를 첨가하였다. 실온 암소에서 15분간 배양한 후 binding buffer 400 μ l를 첨가한 다음 1시간 이내에 Coulter Epics XL Flow cytometry system (Beckman Coulter)으로 분석하였다.

6) Western blot 분석

Bcl-2와 bax 단백질의 발현 정도는 SDS-PAGE를 이용한 western blot으로 분석하였다. HeLa 세포에 cell lysis buffer (Promega)를 넣어 4°C에서 한 시간 동안 세포를 용해시켰다. 단백질량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준 단백질로 하여 Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad laboratories, USA)로 측정하였다. 이렇게 하여 얻은 단백질을 먼저 전

기영동으로 20 mA에서 4시간 동안 실시하여 분리하였다. 젤에서 분리된 단백질은 250 mA에서 3시간 동안 PVDF membrane (Roche, USA)으로 이동시켰다. 그 후 5% skim milk (DIFCO, USA)로 1시간 동안 blocking한 후 각 암유전자의 산물에 대한 bcl-2와 bax 항체가 들어있는 4°C, 0.05% Tween 20이 포함된 PBS에서 밤새 교반하였다. 이를 PBS로 세척한 후 2차 항체를 가하여 실온에서 1시간 반응시키고 다시 세척하여 ECL kit (Amersham Pharmacia biotech, UK)를 사용하여 발색시켰다. 일차 항체는 mouse anti-Bcl-2 단클론

항체(BD Pharmingen)와 mouse anti-Bax 단클론항체(BD Pharmingen), mouse anti- α -Tubulin 단클론항체(Sigma)를 각각 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1,000의 비율로 희석하여 사용하였고, 이차 항체로는 peroxidase-conjugated goat-anti mouse immunoglobulins (DAKO, Denmark)은 1 : 2,000으로 희석하여 사용하였다.

7) 통계 처리

세포생존 분획에 대한 자료 분석은 측정자간 변이를 고려하여 각 측정자가 동일한 약물처리로 3회 측정된 후 이를 종합하여 측정자간 변이와 측정자 고유의 오차를 최소화하였고, 이를 대조군의 SF에 대한 비율로 환산하여 평균값과 표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 각 변수에 대해 통계학적 유의성을 검정하기 위해 SAS V8.01을 이용하여 일반 선형 모형(general linear model)을 이용한 분산분석을 시행하여 p-value를 구하였으며 유의수준은 0.05로 하였다.²⁰⁾

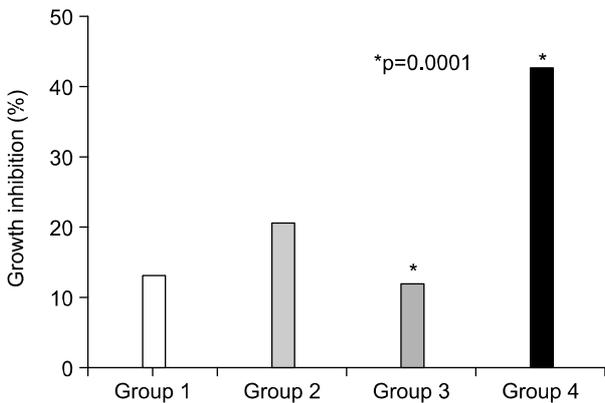


Fig. 1. The effect of radiation, NS 398 and AG 1478 on cancer cell growth inhibition. Data represent mean and standard errors of three different experiments, each performed in triplicate. Cells were counted as described in “materials and methods”. The dose was 5 Gy for radiation, 10 μ M for AG 1478, and 50 μ M for NS 398. The data of percent growth inhibition was 13.00±3.05% for radiation group (Group 1), 20.60±3.87% for radiation and AG 1478 group (Group 2), 11.90±1.17% for radiation and NS 398 group (Group 3), and 42.7±2.56% for radiation, NS 398 and AG 1478 group (Group 4).

결 과

1. 세포성장 억제 분석(Cell growth inhibition assay)

모든 실험군에서 세포성장 억제는 약물의 농도와 시간에 비례하는 양상을 보였고, 방사선과 두 약물을 복합 처리한 4군에서 가장 높은 세포성장 억제를 보였다(p=0.0001). 4군, 2군, 1군, 3군의 순서로 성장 억제가 나타났고 2군은 1군에 비해 30% 높은 세포성장 억제를 나타내었다 (Fig. 1).

2. 세포주기 분석(Cell cycle analysis)

HeLa 세포에 방사선과 약물 처리 시 나타나는 세포주기

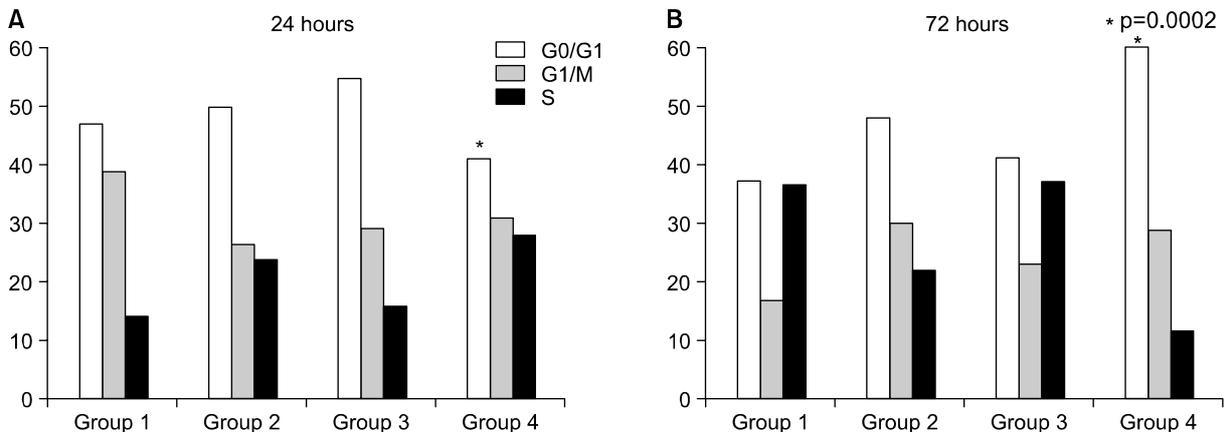


Fig. 2. Cell cycle analysis of HeLa cells at 24 hours (A) and 72 hours (B). Cell cycle distribution was assessed using flow cytometry. The radiation, NS 398 and AG 1478 group caused an accumulation of cells in the G₀/G₁ phase and thus inhibited transition to the S phase (p<0.0002). Group 1: radiation group, Group 2: radiation and AG 1478 treated group, Group 3: radiation and NS 398 treated group, Group 4: radiation, NS 398 and AG 1478 treated group.

변화는 시간이 경과함에 따라 다른 양상으로 나타났다. 방사선 조사 후 24시간에 측정된 세포주기 분석 결과는 3군에서 가장 높은 G₁ 주기 정체를 보였고, 모든 실험군에서 G₁ 주기 정체가 뚜렷이 관찰되었다. 72시간 뒤 측정된 세포주기 양상은 1, 2, 3군에서 모두 G₁ 정체가 감소하고 S 분획이 증가하는 양상을 보였고, 4군에서는 G₁ 정체가 유지되면서 S 분획이 가장 낮게 관찰되었다. 방사선 조사 후 72시간 뒤 측정된 G₁ 정체 세포 분획은 4군에서 가장 높은 증가를 보였다(p=0.0002). 3군에 비해 2군에서 G₁ 주기 정체가 오랫동안 유지되었으며 G₁ 정체에 놓인 세포 분획도 증가하였다(Fig. 2).

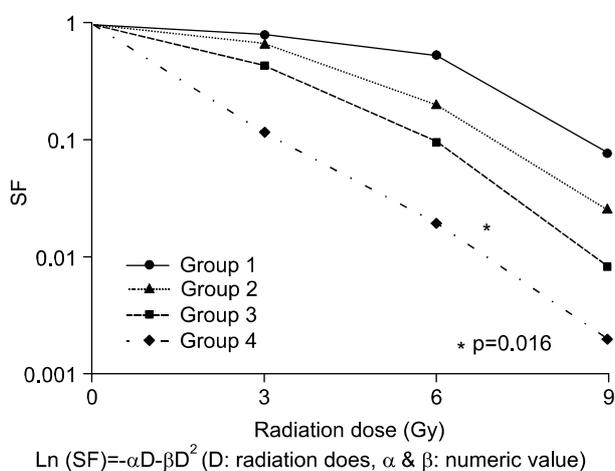


Fig. 3. Enhanced effects of radiation and/or NS 398, AG 1478 treatment on the survival fraction of the human cervical HeLa cells. Differences in survival fraction among treatment groups were evaluated using the generalized linear regression model test. Survival fraction was significantly different between the radiation, NS 398 and AG 1478 group and the radiation alone group (p=0.016), the radiation, NS 398 and AG 1478 and the radiation and AG 1478 group (p=0.0064), the radiation, NS 398 and AG 1478 group and the radiation and NS 398 group (p=0.0212).

3. 세포생존 분석(Cell survival assay)

1군에 비해 다른 실험군에서 방사선 감수성이 얼마나 증가하는지를 살펴보기 위해 집락수를 계수하여 세포생존 분획을 통해 살펴보았다. 4군에서 방사선 감수성 증가가 가장 높게 나타났으며(DER=3.00)(Fig. 3), 3군에 비해 2군에서 방사선 감수성 증가가 높았다(DER 1.12 vs 1.50). 방사선 조사 2 Gy에서의 세포생존 분획(SF₂)은 1군 0.88±0.07, 2군 0.44±0.17, 3군 0.68±0.08, 그리고 4군에서 가장 낮은 0.12±0.01로 분석되었다(p=0.016)(Table 2).

4. 세포사멸 분석(Apoptosis)

Flow cytometry를 이용한 annexin 양성 세포 분획으로 측정된 세포사멸은 4군에서 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 4). 세포사멸 분획 수치는 1군 6.39±0.6%, 2군 8.49±0.5%, 3군 7.10±0.3%, 4군 22.70±1.3%로 나타났다. 2군과 3군에 비해 4군에서 세포사멸 분획 정도가 유의하게 증가되었다(p=0.003)(Table 3).

5. Western blot 분석

대조군에 비해 모든 실험군에서 bcl-2와 bax 단백질 발현

Table 2. The Lethal Efficacy of Radiation in the HeLa Cell Line Treated with/without NS 398 and AG 1478

Groups	SF ₂ (±S.D)*	DER [†]
Group 1	0.88±0.07	1.00
Group 2	0.44±0.17	1.50
Group 3	0.68±0.08	1.12
Group 4	0.12±0.01 [‡]	3.00

*SF₂: survival fraction at 2 Gy, [†]DER: dose enhancement ratio, [‡]p=0.005

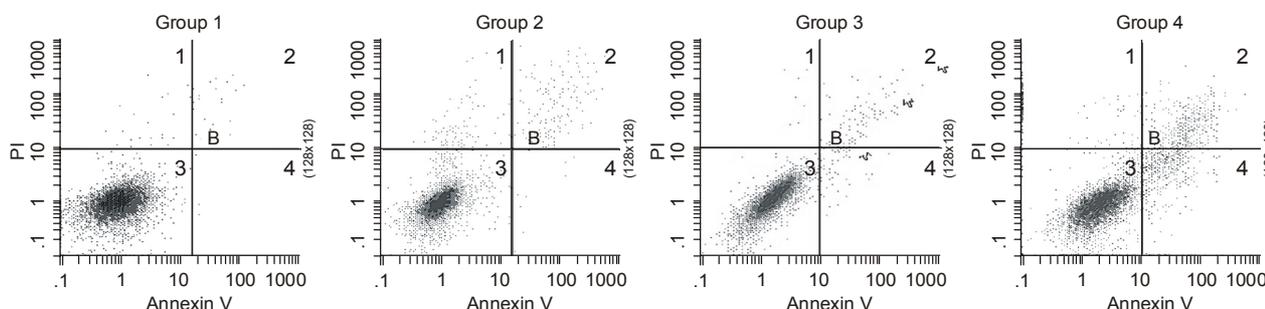


Fig. 4. Density plots of HeLa cells treated with radiation, NS 398 and AG 1478. Radiation and two drugs induced apoptosis was quantified after treatment, by staining with Annexin-V-fluos and analyzing by flow cytometry. The background level of apoptosis in the HeLa cells was 3% (lower right quadrant): At 72 hours after treatment with radiation, NS 398 and AG 1478, the level of apoptosis was 22.70±1.3%.

Table 3. The Radiation Induced Apoptosis in the HeLa Cell Line Treated with/without NS 398 and AG 1478

Group	apoptosis (%)	S.E (%) [†]
Group 1	6.39	±0.6
Group 2	8.49	±0.5
Group 3	7.10	±0.3
Group 4	22.70*	±1.3

*p=0.003, † S.E: standard errors

이 감소되는 양상을 보였으며, 4군에서 발현 정도가 가장 감소하였다. 4군의 경우 bcl-2 단백질 발현은 대조군에 비해 1.3배 감소된 발현 수준을 유지하였고, bax 단백질 발현은 2.5배 이상 낮은 발현 수준을 유지하였다. 2군과 3군에서도 bcl-2 단백질 발현 감소에 비해 bax 단백질 발현 감소가 두드러진 양상을 보였다(Fig. 5).

고안 및 결론

암 발현 및 세포증식에 관여되는 다양한 신호전달체계를 표적으로 하는 치료의 개념은 많은 연구자들의 관심 대상이 되고 있다. 분자표적 치료(molecular target therapy)는 기존의 항암제나 방사선 치료에 비해 부작용이 적으므로 치료 효율을 높이는 유용한 치료법이 될 수 있다.²¹⁾ 그러나 암세포 성장과정은 한 가지 표적뿐만 아니라 또 다른 다양한 신호전달체계를 이용하므로 한 가지 표적을 차단할 경우, 하나의 보상반응으로써 다른 신호전달 경로를 활성화시켜 암세포 성장이 억제되는 것을 방해한다.^{21,22)} 따라서 공존하는 여러 개의 신호전달 경로를 동시에 치료표적으로 삼는 복수 분자 표적 치료가 필요하다. Raben 등²¹⁾은 EGF 수용체 차단제인 ZD 1839, C-AMP dependent kinase inhibitor (type I PKA), VEGF antisense oligonucleotide와 anti-erbB-2인 trastuzumab을 병용 투여한 동물 실험과 임상 시험에서 지속적인 항암효과를 보였다고 발표하였고, Jung 등²²⁾도 murine anti-VEGF antibody인 DC 101과 C 225를 동시에 사용하여 위암 세포 증식을 의미 있게 억제할 수 있다고 보고하였다. 인간 대장암을 비롯하여 유방암 세포주와 GEO xenograft를 이용한 Giampaolo 등²³⁾의 실험에서는 EGF 수용체 차단제인 ZD 1839, antisense protein kinase AI (PKAI)와 antisense bcl-2/bcl-xL를 복합 투여하여 특별한 부작용 없이 50% 이상의 암세포 성장억제와 암 소멸 효과를 발표하였다. 이와 같이 암 치료 성적을 더욱 향상시키기 위해서는 복수 표적 약물을 기존의 항암제나 방사선 치료와 병용하는 병합 치료가 요구되며, 이 분야의 연구가 선

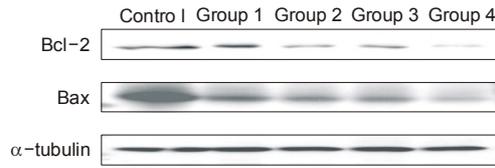


Fig. 5. Western blot showing the levels of bcl-2 and bax protein in HeLa cells after treatment. Expression of bcl-2 and bax was more decreased in HeLa cells treated with radiation, NS 398 and AG 1478.

행되어야 한다.

EGF 수용체는 세포 성장에 필요한 신호전달경로에 관여하는 수용체로써 다양한 신호 전달체계를 경유하여 상피세포의 성장을 조절한다. 인간의 암세포에서 과 발현되며 악성종양의 성장과 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾ 진행된 두경부암, 유방암, 자궁경부암 환자와 비소세포성 폐암 환자에서 과 발현되어 있는 것으로 보고되고 있다.⁸⁻¹²⁾ EGF 수용체가 과 발현된 종양의 경우, 불량한 예후와 진행된 병기를 보이며 기존의 항암제와 방사선 치료에 대한 반응이 낮은 경우가 많으므로,³⁻⁷⁾ EGF 수용체 발현과 그 신호전달 경로는 방사선 감수성에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다.²⁴⁻²⁶⁾ 1990년대 후반부터 EGF 수용체 차단제와 방사선 병용 치료에 관한 연구가 매우 활발하게 진행되었고, 고무적인 실험 결과들을 얻게 되었다. 진행성 또는 전이성 비소세포 폐암 환자에게 기존의 방사선 치료와 EGF 수용체 차단제를 추가한 결과, 방사선 단독 치료에 비해 치료 상승효과가 있었고,^{11,12)} 진행된 두경부종양 환자에서 방사선과 함께 EGF 수용체 차단제를 병용한 결과 방사선 단독치료에 비해 긍정적인 효과를 보여주었다.⁸⁻¹¹⁾ 이와 같은 EGF 수용체 차단제에 의한 방사선 효과를 확인하면서 추가로 다른 신호전달 체계를 억제하는 표적 치료제를 함께 투여할 경우 치료 효과를 더욱 증가시킬 수 있을 것이라고 예측하게 되었다.

본 실험에 사용된 선택적 COX-2 억제제는 많은 연구에서 항암 치료 효과를 증진시키는 것으로 알려진 약물이다. Eiko 등²⁷⁾은 A 431 human tumor를 xenograft한 nude mice에서 COX-2 억제제인 Celecoxib[®]를 사용한 결과, 방사선의 DER이 1.43이었고, Docetaxel[®]에서는 항암제의 DER이 2.07이었다고 보고하였다. 또 다른 선택적 COX-2 억제제인 NS 398을 이용한 Pyo 등¹⁷⁾의 연구에서는 폐암 xenograft model에서 방사선의 선량 증가효과가 2.5이었다고 발표하였다. 2003년에 발표된 제2상 임상 시험에서는 초기 비소세포 폐암 환자의 수술 전 항암 약물 치료에 선택적 COX-2 억제제인 Celecoxib[®]를 하루 800 mg 경구 복용한 결과 특

별한 부작용 없이 항암 약물 치료 효과가 증가된 것으로 보고하였다.²⁸⁾

본 연구에서 두 가지 분자표적 약물을 이용하여 HeLa 세포에서 방사선과 병행하여 세포 살상에 미치는 효과를 실험한 결과, 방사선 단독 처리군에 비해 방사선과 AG 1478 복합 처리군에서 세포성장 억제 효과가 높았으며, 방사선과 NS 398, AG 1478 두 약물 복합 처리군에서 세포성장 억제 효과가 가장 높은 것으로 나타났다. 또 방사선과 한 가지 약물 복합 처리군에서는 뚜렷한 세포생존 분획 감소를 보이지 않았으나, 방사선과 NS 398, AG 1478 복합 처리군에서 세포생존 분획이 현저한 감소를 보였다. 방사선에 의한 암세포의 반응은 암세포의 세포사멸 유도 향상을 포함하여 여러 기전에 의해서 결정된다. Flow cytometry를 이용한 세포사멸 계수 결과는 방사선과 NS 398, AG 1478 복합 처리군에서 뚜렷한 세포사멸 유도 증가를 보였고, 방사선과 한 가지 약물 복합 처리군에 비해 방사선과 NS 398, AG 1478 복합 처리군에서 3~4배 이상 세포사멸 정도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 지금까지 다른 문헌에서 발표된 두 약제의 용량은 NS 398의 경우 대부분 300 μ M 이상을 투여하였고,^{17,19)} AG 1478의 경우 20 μ M 이상을 사용하여 방사선 치료 효과 증가를 살펴본 실험이 대부분이었으나,^{29,30)} 본 연구에서는 두 약물의 방사선 감수성 상승효과를 보기 위해 AG 1478의 경우 IC₅₀ 값보다 10배 이상 낮은 약물 농도를 선택하였고, NS 398의 경우 4배 낮은 약물 농도를 선택하였다. 그 결과 다른 연구에서 사용했던 약의 용량보다 낮은 농도의 약물을 투여해도 선택적 COX-2 억제제와 EGF 수용체 차단제를 병용하여 HeLa 세포의 방사선 살상 효과를 크게 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

방사선에 의하여 손상된 DNA 복제 또는 이에 따라 나타나는 세포의 형질 변환 등을 방지하기 위하여 세포 자체의 방어기전인 세포주기 정체가 유도된다.³¹⁾ 정상적인 세포에 방사선을 조사하면 G₁ 세포주기에서 세포주기 진행이 멈추는 현상이 대부분의 경우에서 나타난다.^{24~26)} 일반적으로 G₁, G₂ 세포주기 정체는 세포 손상을 복구하기 위한 과정으로 다음 주기로 진행하기 전 세포 보호기전에 의해 나타나는 현상으로 알려져 있다.^{32~35)} HeLa 세포에서 세포사멸과 연관하여 세포주기 변화를 살펴본 연구는 많지 않다. Kim 등³⁶⁾은 방사선과 아스피린을 HeLa 세포에 처리 후 세포사멸 유도와 세포주기 변화를 관찰한 실험에서 방사선과 아스피린 농도에 비례하여 G₁ 세포주기 정체가 우월하다고 발표하였다. Agarwal 등³⁴⁾은 HeLa 세포에 p53 발현 adenovirus를 전달 감염시킨 후 유전자 발현과 세포주

기 변화를 관찰한 실험에서 G₁ 세포분획이 전달 감염 후 53%에서 91.9%로 증가되었다고 하였다. 본 연구에서도 HeLa 세포에 방사선을 조사하거나 EGF 수용체 차단제와 선택적 COX-2 억제제를 투여한 경우 24시간 경과 후 G₁ 주기 정체가 우월하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 세포주기 변화 시간은 방사선 단독 처리군, 방사선과 단일 약물복합 처리군 등에서 24시간 뒤 G₁ 세포주기 정체에서 S 주기로 다시 진행되는 반면, 방사선과 NS 398, AG 1478 복합 약물처리군의 경우는 72시간 경과 후에도 G₁ 세포주기 정체가 유지되는 현상이 관찰되었다. 이는 G₁ 세포 정체에서 S 세포주기로 느리게 진행될수록 세포 손상이 크다는 것을 의미하여 빠른 세포 분열이 저해되므로 암 치료 효과가 높아진다는 것을 예측할 수 있다.³⁷⁾ 본 실험에서 보여주었던 L-Q model을 이용한 세포생존곡선에서도 방사선과 AG 1478, NS 398 복합 약물 처리군에서 생존곡선 초기에 'shoulder'가 사라진 것으로 보아 아치사 손상 회복(sub-lethal damage repair) 이 거의 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다.

HeLa 세포에서 방사선에 의해 세포사멸을 유도하는 기전은 명확하지 않다. 지금까지 알려진 연구에 의하면 방사선에 의한 세포사멸은 주로 p53 의존성 신호전달경로에 의해 유도되며 bcl-2, bax와 caspase-3 등이 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁷⁾ HeLa 세포는 p53 돌연변이 유전자를 가진 세포이므로 HeLa 세포에서 유발된 세포사멸은 p53 의존성 신호전달경로와는 무관할 것으로 보인다. 최근의 보고에 따르면 HeLa 세포에서 방사선과 아스피린을 투여할 경우 세포사멸이 유발되고 caspase-3 증가와 bcl-2 감소가 동반된다.³⁶⁾ 세포사망 억제자인 bcl-2는 미토콘드리아 외막에 위치하며, 세포사망 및 미토콘드리아막 전위의 감소를 억제함으로써 세포사멸 유도를 저해한다. 본 연구에서도 western blot 결과 bcl-2 단백질 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었고, p53 기능은 소실되었지만 bcl-2 감소에 의해 세포사멸이 촉진되는 것으로 사료된다. 세포사망 억제자인 BAG-1이 감소하면 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome C가 분비되고 세포사망 촉진자인 bax가 세포질에서 미토콘드리아로 방출되므로 세포사멸이 일어난다고 설명하기도 한다.³⁸⁾ Cytochrome C는 caspase-3 활성화 및 DNA 분절에 필요한 성분이며, 세포사멸 과정에서 미토콘드리아로부터 방출되고, bcl-2와 bcl-xL 등의 세포질로의 유입을 억제하는 것으로 알려졌다.^{37,38)} 본 연구에서는 bcl-2와 bax 단백질 발현 변화만 살펴보고, 두 단백질 발현이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 향후 미토콘드리아와 세포질 내 bcl-2, bax의 변화와 cytochrome C 방출 등에 관한 추가적인

연구가 필요할 것으로 생각된다. 또 다른 보고에서는 세포 내에 다발적으로 존재하는 ATP 수치에 의해 세포사멸이 유도되며 ATP 수치는 미토콘드리아 내 bax 이동과 cytochrome C에 직접적인 영향을 미친다고 발표하였다. ATP 수치가 일정한 수준으로 떨어지면 세포사멸이 유도되고, 30배 이상 떨어지거나 3시간 이상 세포 내에 존재할 경우 세포괴사가 진행이 된다고 보고하였다.³⁹⁾ 지금까지 나온 문헌을 종합해 보면 돌연변이 p53 유전자를 가진 HeLa 세포에서 유도되는 세포사멸은 p53을 경유하는 신호전달경로와는 무관하게 조절되는 것임을 알 수 있었고, bcl-2와 bax 비율 변화, cytochrome C 등에 의해 미토콘드리아막 전위가 유발되어 일어나는 것으로 추정된다.

방사선 치료는 자궁경부암 환자에서 주된 치료방법으로 이용되고 있다. 이전까지 EGF 수용체 차단제에 관한 많은 연구가 진행되었지만 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에서 방사선 치료, EGF 수용체 차단제와 선택적 COX-2 억제제를 함께 병용한 연구는 처음으로 시도되었으며 방사선에 의한 세포살상 효과를 높이는 데 도움이 됨을 확인하였다. 분자표적 치료 약물은 정상세포에는 손상을 주지 않고 암 세포에 존재하는 물질이나 기전을 표적으로 항암효과를 나타내므로 기존의 항암약물에 비해 부작용이 적다. 서로 다른 분자신호전달체계에 영향을 미치는 새로운 약제들의 개발도 중요하지만 기존의 분자표적치료 약물을 효과적으로 복합하여 방사선과 항암 약물치료와 병용하여 치료 효과를 증진시킬 수 있는 방법에 관한 연구가 활발히 진행되어야 할 것으로 사료된다.

HeLa 세포주에 대하여 선택적 COX-2 억제제, EGF 수용체 차단제를 방사선 조사와 단독 또는 복합 병용하였다. 방사선 조사와 선택적 COX-2 억제제, EGF 수용체 차단제를 복합적으로 병용하였을 때 성장억제 및 세포사멸이 한 가지 약물을 투여하였을 때 보다 높게 나타났으며, SF₂는 낮았고, DER은 높았다. 복합적으로 약물을 병용하였을 때는 G₀/G₁ 주기 정체와 S 분획 소실이 72시간 유지되었으며 western blot에서 bcl-2와 bax의 발현이 감소되었다.

이상의 결과로부터 선택적 COX-2 억제제와 EGF 수용체 차단제의 복합 투여가 단독 약물투여에 비해 HeLa 세포주의 방사선 감수성을 더욱 증가시킴을 확인할 수 있었다. 이로부터 방사선 치료 또는 방사선 치료와 항암제 병용에도 불구하고 종양의 반응이 불량하거나, 환자의 치료에 대한 적응도가 낮은 경우 선택적 COX-2 억제제와 EGF 수용체 차단제와 같은 분자표적 약제를 병합함으로써 치료효과를 증강시킬 수 있음을 확인하였을 뿐만 아니라, 두 가지 이상의 분자표적약물을 복합 투여함으로써 이러한 증

강 효과가 한층 강화될 수 있음을 확인하였다.

향후 동물실험을 통하여 생체에서도 이러한 증강효과를 확인하고 복합투여의 안전성을 확인하는 실험이 계속 이어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kim GE. Targeted therapies and radiation for the treatment of head and neck cancer. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2004; 22;70-90
2. Park HS, Lee NS. Molecular targeted therapy in cancer. *J Kor Med Assoc* 2003;147:542-548
3. David R, Barb H, Paul A, et al. Targeted therapies for non-small-cell lung cancer: biology, rationale, and preclinical results from a radiation oncology perspective. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:27-38
4. Herbert RS, Maddox AM. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002;20:3815-3824
5. Hidalgo M, Siu LL, Nemunaitis J. Phase I and pharmacological study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 2001;19:3267-3279
6. Baselag J, Reschin D, Ranson M, et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol* 2002;20:4292-4302
7. Vanhoefler U, Tewes M, Rojo F, et al. Phase I study of the humanized anti-epidermal growth factor monoclonal antibody EMD 7200 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor. *J Clin Oncol* 2004;22:175-184
8. Matar P, Rojo R, Guzman M. Combined anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) treatment with a tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) and monoclonal antibody (IMC-C225) Evidence of synergy. *Proc AACR* 2003;44:918
9. Cataldo B, Roberto B, Giampaolo T, et al. Antitumor activity of combined treatment of human cancer cells with ionizing radiation and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 plus type I protein kinase. *Clin Cancer Res* 2000;6:4343-4350
10. Giralt P.M, Harari K, Ang N, et al. A phase III study of high dose radiotherapy with or without cetuximab in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol* 2004;73(Suppl 1):217
11. Baselga J, Herbst R, Lorusso P, et al. Continuous administration of ZD 1839 (Iressa), a novel oral epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), in patients with five selected tumor types: evidence of activity and good tolerability (Abst.686). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:177a
12. Herbst RS, Maddox AM, Rothenberg ML, et al. Selec-

- tive epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002;20:3815-3825
13. Williams CS, Tsujii M, Reese J, et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1589-1594
 14. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-182
 15. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908-7916
 16. Palayoor ST, Bump EA, Calderwood SK, et al. Combined antitumor effect of radiation and ibuprofen in human prostate carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1998;4:763-771
 17. Pyo H, Choy H, Amorino GP, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res* 2001;7:2998-3005
 18. Weimin L, Yuhchayou C, Wei W, et al. Combination of radiation and celebrex (celecoxib) reduce mammary and lung tumor growth. *Am J Clin Oncol* 2003;26:100-103
 19. Nazanin A, Lynn H, Melanie S, et al. NS 398 radiosensitizes and HNSCC cell line by possibly inhibiting radiation-induced expression of COX-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;5:1405-1412
 20. Kaplan EL, Meir P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481
 21. Raben D, Bianco C, Milas L, et al. Targeted therapies and radiation for the treatment of head and neck cancer: are we making progress? *Semin Radiat Oncol* 2004;14:139-152
 22. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, et al. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur J Cancer* 2002;38:1133-1140
 23. Giampaolo Tortora, Rosa Caputo, Vincenzo Damiano, et al. Combined targeted inhibition of bcl-2, bcl-xL, epidermal growth factor receptor, and protein kinase a type I causes potent antitumor, apoptotic, and antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2003;9:866-871
 24. Huang SM, Jonathan M, Bock M, et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:1935-1940
 25. Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 1997;3:2703-2707
 26. Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damaged repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2166-2174
 27. Eiko NM, Kathryn A, Mason M, et al. Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:369-375
 28. Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, et al. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non small lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2645-2650
 29. Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res* 2002;62:4307-4315
 30. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science (Wash. DC)* 1995;267:1782-788
 31. Huang SM, Li J, Harari PM. Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther* 2002;1:507-514
 32. Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996;78:1284-1292
 33. Jeong SJ, Jeong MH, Jang JY, et al. Regulatory mechanism of radiation induced cancer cell death by the change of cell cycle. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2003;21:306-314
 34. Agarwal ML, Agarwal M, Taylor WR, Stark GR. P53 control both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8493-8497
 35. Grandis J, Tweardy D. Elevated levels of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:3579-3584
 36. Kim KY, Seol JY, Jeon GA, Nam MJ. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cell. *Cancer Letters* 2003;183:157-166
 37. Lee HS, Choi YM, Kwon JC, et al. A novel chenodeoxycholic derivative HS-1200 enhances radiation-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2004;22:145-154
 38. Jieying X, Jun C, Garry C, et al. Antisense BAG-1 sensitizes HeLa cells to apoptosis by multiple pathways. *BBRC* 2003;312:585-591
 39. Denis S, Armine V, Olga Yu, et al. Wages of fear: transient threefold decrease in intracellular ATP level impose apoptosis. *Biochem Biophys Acta* 2004;1658:141-147

Abstract

The Modulation of Radiosensitivity by Combined Treatment of Selective COX-2 Inhibitor, NS 398 and EGF Receptor Blocker AG 1478 in HeLa Cell Line

Seon Min Youn, M.D.*, Young Kee Oh, Ph.D.*, Joo Heon Kim, M.D.[†], Mi Ja Park, M.D.[†], In Ock Seong[†], Kimun Kang, M.D.[‡] and Gyuyong Chai, M.D.[‡]

Departments of *Radiation Oncology and [†] Pathology, Eulji University School of Medicine, Daejeon, [‡] Department of Radiation Oncology, Gyeongsang National University College of Medicine, Jinju, Korea

Purpose: Selective inhibition of multiple molecular targets may improve the antitumor activity of radiation. Two specific inhibitors of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) were combined with radiation on the HeLa cell line. To investigate cooperative mechanism with selective COX-2 inhibitor and EGFR blocker, *in vitro* experiments were done.

Materials and Methods: Antitumor effect was obtained by growth inhibition and apoptosis analysis by annexin V-Fluorescein method. Radiation modulation effects were determined by the clonogenic cell survival assay. Surviving fractions at 2 Gy (SF₂) and dose enhancement ratio at a surviving fraction of 0.25 were evaluated. To investigate the mechanism of the modulation of radiosensitivity, the cell cycle analyses were done by flow cytometry. The bcl-2 and bax expressions were analyzed by western blot.

Results: A cooperative effect were observed on the apoptosis of the HeLa cell line when combination of the two drugs, AG 1478 and NS 398 with radiation at the lowest doses, apoptosis of 22.70% compare with combination of the one drug with radiation, apoptosis of 8.49 %. In cell cycle analysis, accumulation of cell on G₀/G₁ phase and decrement of S phase fraction was observed from 24 hours to 72 hours after treatment with radiation, AG 1478 and NS 398. The combination of NS 398 and AG 1478 enhanced radiosensitivity in a concentration-dependent manner in HeLa cells with dose enhancement ratios of 3.00 and SF₂ of 0.12 but the combination of one drug with radiation was not enhanced radiosensitivity with dose enhancement ratios of 1.12 and SF₂ of 0.68 (p=0.005). The expression levels of bcl-2 and bax were reduced when combined with AG 1478 and NS 398.

Conclusion: Our results indicate that the selective COX-2 inhibitor and EGFR blocker combined with radiation have potential additive or cooperative effects on radiation treatment and may act through various mechanisms including direct inhibition of tumor cell proliferation, suppression of tumor cell cycle progression and inhibition of anti-apoptotic proteins.

Key Words: Selective COX-2 inhibitor, EGFR blocker, Radiation, HeLa cell line