

백서 교종 세포에서 레티노인산에 의한 카탈라제의 활성 증가가 방사선감수성에 미치는 효과

충북대학교 의과대학 방사선종양학교실[†], 약리학교실* 및 의학연구소[†], 건국대학교 의과대학 기생충학교실[‡]

김 화* · 전하연[†] · 박우윤[†] · 김원동[†] · 안희열* · 유재란[‡]

목적: *all-trans* retinoic acid (ATRA)는 뇌종양 세포의 증식억제효과가 있으며, ATRA와 방사선의 병용은 악성 뇌종양의 치료 효과를 증진시키는 방법이 될 수 있다. 그러나 ATRA에 의해 항산화효소가 증가되며 이로 인해 방사선에 의해 생성된 reactive oxygen species (ROS)가 제거된다면 방사선의 효과는 낮아질 수 있다. 본 연구에서는 ATRA에 의해 유도되는 카탈라제(catalase)에 의한 방사선감수성의 변화를 보고자하였다.

대상 및 방법: 백서 교종세포(36B10)를 대상으로 ATRA 및 ATRA의 화학적 억제제인 3-amino-1, 2, 4-triazole (ATZ) 와 병용하여 카탈라제 활성도, 방사선감수성 및 ROS의 변화를 측정하였다. 카탈라제 활성도는 H₂O₂의 소멸을 자외선 분광광도계로 측정하는 방법을 이용해 정량하였으며, 방사선감수성은 단일집락균형성능력으로, ROS 는 2, 7-dichlorofluorescein diacetate 를 분광광도계로 측정하였다.

결과: 카탈라제 활성도는 ATRA의 농도(10, 25, 50 μ M)에 따라 증가하였다. ATRA (10 μ M)와 방사선(4 Gy)의 병용에 의해 생존분획은 상승적(supra-additive)으로 감소하였으며, 이 감소된 생존분획은 ATZ 동시 투여에 의해 증가하였다. ATRA 10 μ M 또는 25 μ M을 48시간 처리 후 ROS는 대조군에 비해 각각 1.5배, 2배 증가하였고, 4 Gy와 ATRA의 병용군에서는 2.5배 증가하였다. ATRA와 방사선의 병용에 의해 증가된 ROS는 ATZ에 의해 감소되었다.

결론: ATRA에 의해 유도되는 카탈라제는 방사선감수성을 감소시키지 않으며, 오히려 ROS의 증가에 의해 방사선감수성을 상승시켰다. 따라서 ATRA와 방사선의 병용은 뇌종양의 치료에 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 보인다.

핵심용어: 레티노인산, 뇌종양, 방사선감수성, 카탈라제

서 론

보건복지부에서 발표한 한국중앙암등록사업 연례보고서에 의하면 2002년에 우리나라에서 발생한 원발성 뇌종양 환자는 전체 암 발생의 1%, 전체 암 사망의 1.9%를 차지한다.¹⁾ 원발성 뇌종양의 35~45%는 악성 교종이며, 이 중 약 50~85%가 다형성교모세포종이다.²⁻⁴⁾ 악성 교종은 주위 정상조직으로 침윤되어 근치적 절제가 불가능하고, 방사선

감수성 및 항암제에 대한 감수성이 낮아, 수술, 방사선, 화학요법에도 불구하고 중앙생존기간이 9~13개월이며, 5년 이상 생존율은 5% 이하이다.²⁻⁵⁾ 악성 교종은 발생빈도는 비교적 적지만 생존율은 매우 낮아 새로운 치료방법의 개발이 절실히 요구된다.

all-trans-retinoic acid (ATRA; tretinoin) 는 각종 암의 치료 및 예방에 사용되고 있고, 사람 및 동물의 교종세포의 증식억제 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.^{6,7)} 그러나 실제 임상 시험의 결과는 그리 괄목할 만하지 못했다.⁸⁻¹⁰⁾ ATRA는 retinoic acid receptor (RAR)에 친화력이 높으며, ATRA에 의해 활성화된 RAR의 생물학적 작용은 주로 retinoid X receptor (RXR)와 결합을 통하여 이루어지는데, RXR은 다시 감상선호르몬, 비타민 D 또는 과산화체증식활성수용체 (peroxisome proliferation-activating receptor; PPAR) 등과 같은 다양한 핵 호르몬 수용체(nuclear hormonal receptor)와 결합

이 논문은 2005년 11월 1일 접수하여 2000년 12월 5일 채택되었음. 본 연구는 2002년 한국과학재단 지역대학우수과학자지원사업(과제번호: E00098, 접수번호: R05-2002-000-00786-0)의 지원으로 이루어졌음.

책임저자: 박우윤, 충북대학교병원 방사선종양학과
Tel: 043)269-6376, Fax: 043)269-6387
E-mail: wynpark@chungbuk.ac.kr

한다.¹¹⁾ 또한 ATRA는 세포질 내에서 9-cis-retinoic acid (9cRA)로 상호 변환하며, 9cRA는 핵 내의 RAR 또는 RXR에 결합하여 생물학적 작용을 유발한다.

ATRA는 superoxide dismutase (SOD), 환원형 glutathione (GSH), 카탈라제(catalase), γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -GCS) 등을 유도하므로 산화성 스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화기능에 관여하는 것으로 인식되어왔다.¹²⁾ ATRA는 방사선감수성을 증가시키는 것으로 알려져 왔으며, 이의 기전으로는 방사선조사 후 잠재치사손상 회복의 억제, 세포주기 조절과 분화 유도 등이 주장되었다.^{13~15)} 그러나 ATRA에 의해 유도되는 항산화효소가 방사선감수성증가와 관련이 있는지는 보고된 바 없다. ATRA에 의한 방사선감수성의 증가는 ATRA 자체에 의한 세포증식억제 효과와 더불어 상승적 작용(supra-additive effect)을 기대할 수 있다. 한편 ATRA에 의해 항산화효소가 증가된다면 free radical을 매개로 하는 방사선의 작용을 감소시킬 수도 있다. 따라서 본 연구에서는 ATRA에 의해 유도되는 카탈라제가 방사선감수성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 시약

All trans-retinoic acid (ATRA) (Sigma, St. Louis, MO, 미국)를 DMSO에 녹여 1 mM의 stock을 준비했고 3-amino-1, 2, 4-triazole (ATZ) (Sigma, St. Louis, MO, 미국)은 PBS에 녹였다. Rainbow protein molecular weight marker, ECL reagents kit와 ECL X-ray film은 Amersham Biosciences Corp (Piscataway, NJ, 미국)에서 구입하였고 glycine, glycerol, Tris, 2-mercaptoethanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), protein standard (bovine serum albumin) 및 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다.

2. 세포주와 세포배양

백서 악성뇌종양세포주인 36B10는 미국 University of Iowa의 Larry Oberley 교수에게서 기증 받았다.^{16,17)} 36B10는 Dulbecco's modified Eagle medium에 10% fetal bovine serum, 100 U/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin이 들어 있는 배양액(이하 10% DMEM 배양액이라고 약칭함)으로 5% CO₂/37°C로 유지되는 세포배양기에서 배양하였으며 2~3일마다 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였다. 세포배양에 사용된 모든 시약은 Gibco BRL사

(Grand Island, 미국)에서 구입하였다.

3. 방사선 조사와 retinoic acid의 투여

배양용기에서 자라는 세포의 방사선 조사는 6MV 선형 가속기(Siemens, CA, 미국)를 사용하여 5.38 Gy/min의 선량율로 실온에서 조사하였다. ATRA를 DMSO에 녹여 1 mM의 stock solution을 준비하고, 필요한 농도만큼 배양액에 희석하여 사용하였다. 세포 배양액 내의 DMSO의 농도는 0.1% 이하로 하였다. ATRA는 빛에 민감하여 빛에 노출시 비활성 형태로 전환될 수 있으므로 알루미늄 호일에 싸서 어두운 -20°C 냉장에 보관하였으며, 사용 시 빛에 노출되지 않도록 점등 후 꺼내어 사용하였다.

4. 단일세포집락균형성능력의 측정(Clonogenic assay)

단일세포부유액을 만들어 colony 계측에 적당한 수의 세포를 60 mm 배양접시에 심고 다음날 약물(ATRA+/-ATZ) 처리 1시간 후 방사선 조사를 하고 colony가 관찰될 때까지 배양하였다. 광학현미경(Olympus CK 40, 일본)에서 100 배 비율로 관찰하여 세포가 50개 이상인 colony의 수를 세었다. 생존세포분획(surviving fraction; SF)은 대조군에 대한 실험군의 plating efficiency (평균배양효율) 비로 계산하였다.¹⁸⁾

SF=plating efficiency of treated dishes/plating efficiency of control dishes

5. 카탈라제 활성도의 측정

Superoxide anion으로부터 SOD에 의해 생성되는 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 제거하는 효소인 catalase 활성은 H₂O₂의 소멸을 자외선 분광광도계(UV Spectrophotometer, 미국)로 240 nm에서 측정하는 방법을 이용해 정량하였다(240 nm에서 H₂O₂의 molar extinction coefficient는 43.6 M⁻¹cm⁻¹). 12 mM H₂O₂, 1 mM EDTA를 함유한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 3 ml에 시료 5 μ l를 넣고 30°C, 240 nm에서의 흡광도 변화를 기록하여 1분 동안에 1 μ mole의 H₂O₂를 제거할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.¹⁹⁾

6. Reactive oxygen species (ROS)의 측정

2 \times 10⁴개 세포를 96 well plate (Nunc, 덴마크)에 분주 후 다음날 약물을 투여하여 정해진 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척 후 40 μ M의 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 로 37°C에서 30분 동안 처리 후 PBS로 두 번 씻은 후 PBS 50 μ l를 넣고 방사선 조사 후 미리 켜놓

은 Fluorescence reader (Bio-Rad, 일본)로 형광의 세기를 485 nm excitation/530 nm emission에서 측정하였다.^{20,21)}

결 과

1. ATRA에 의한 카탈라제 활성도의 변화

ATRA 투여에 의한 카탈라제 활성도의 변화를 보고자 세포 배양액에 ATRA를 농도별로 처리하여 일정시간 배양하였다. 0, 10, 25, 50 μ M의 ATRA의 투여 48시간 경과 후 카탈라제 활성도는 ATRA의 농도에 따라 증가하였고, 카탈라제의 화학적 억제제(chemical inhibitor)인 ATZ의 농도 (1, 10 mM)에 따라 감소하였다(Fig. 1).

2. ATRA 및 ATZ의 병용에 의한 방사선감수성의 변화

ATRA에 의한 방사선감수성의 변화를 보고자 10 μ M의 ATRA와 4 Gy의 방사선을 병용하였다. 10 μ M의 ATRA 단독에 의한 SF는 0.5, 4 Gy의 방사선조사 단독에 의한 SF는 0.39였다. 10 μ M의 ATRA와 4 Gy를 병용했을 때 SF는 0.08로 상승적(supra-additive)으로 감소하였다. 즉, ATRA에 의해 방사선감수성이 증가하였다. ATRA에 의한 방사선감수성의 증가와 카탈라제의 연관성을 알아보기 위하여 방사선의 병용군에 1 mM 또는 10 mM의 ATZ를 동시 투여했더니 생존 분획이 유의하게 증가하였다(각각 p=0.0080, p=0.0039). 즉, ATZ에 의한 카탈라제 활성의 억제는 ATRA의 방사선감수성 증강 효과를 감소시켰다. 이는 ATRA에 의

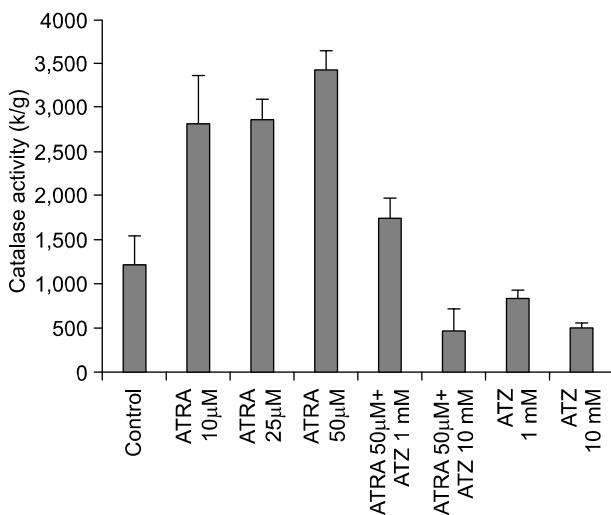


Fig 1. Catalase activity was increased as the concentration of ATRA increased from 10 to 50 μ M for 48 hrs. Aminotriazole (ATZ) decreased catalase activity dose dependently (1, 10 mM) in both ATRA treated and untreated groups. Data are average of four independent experiments.

한 방사선감수성 증강 기전에는 카탈라제가 관여함을 시사하는 것이다. 한편, ATZ 단독에 의해 방사선감수성이 변화하지는 않았다(Fig. 2). 이는 카탈라제 활성의 억제만으로는 방사선감수성이 감소하지 않음을 의미한다.

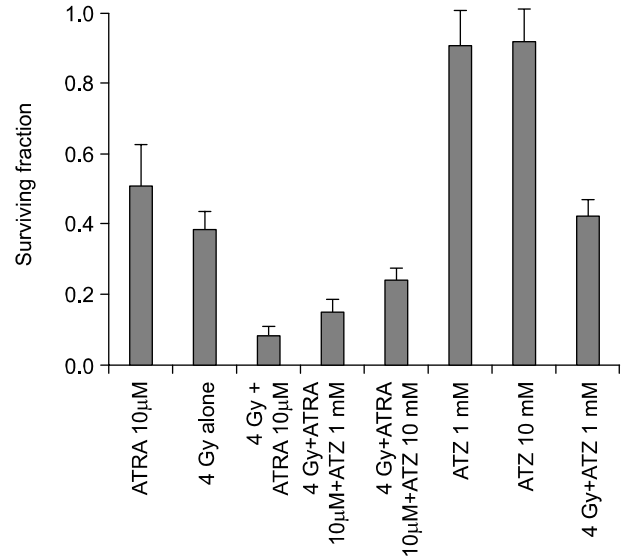


Fig. 2. Clonogenic cell survival. ATRA (10 μ M) increased radiosensitivity, but ATZ (1, 10 mM) decreased the combined effect of radiation (4 Gy) and ATRA. ATZ alone did not affect on the cell survival and radiosensitivity. Data are average of four independent experiments.

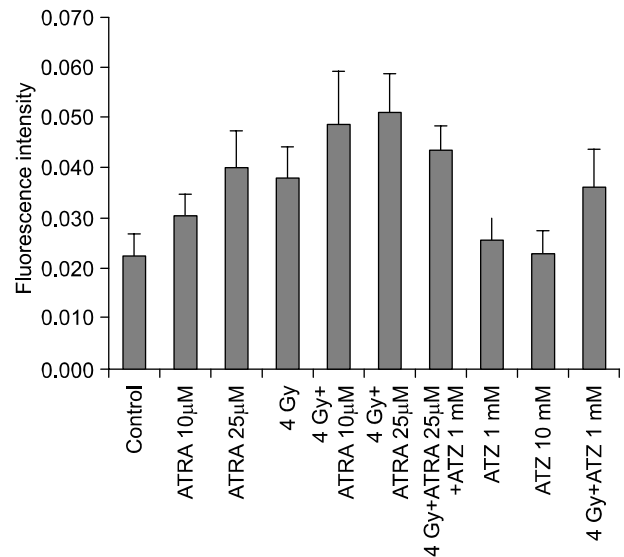


Fig. 3. Generation of reactive oxygen species (ROS) in response to ATRA, radiation and/or ATZ. ATZ decreased the ROS produced by radiation and ATRA. The levels of fluorescence inside the cells were determined by spectrophotometry. Data are average of four independent experiments.

3. ATRA 및 ATZ와 방사선의 병용에 의한 reactive oxygen species (ROS)의 변화

ATRA에 의한 방사선감수성의 증가에 ROS가 관여하는 지 알아보기 위해 ATRA와 방사선조사 후 ROS의 변화를 측정하였다. ATRA 10 μ M 또는 25 μ M을 48시간 처리 후 ROS는 대조군에 비해 각각 1.5배, 2배 증가하였고, 4 Gy와 ATRA의 병용군에서는 2.5배 증가하였다. 이는 ROS 생성의 증가가 ATRA에 의한 방사선감수성 증강의 기전임을 시사하는 것이다. ATZ는 4 Gy와 ATRA의 병용에 의해 증가된 ROS를 감소시켰으나, 대조군 또는 방사선에 의한 ROS의 변화를 초래하지는 않았다(Fig. 3). 즉, ATZ에 의한 카탈라제 활성의 감소는 ATRA에 의해 증가된 ROS의 감소를 초래하며, 이는 카탈라제가 ROS 생성에 관여함을 시사한다.

고안 및 결론

ATRA의 세포증식억제력은 백서 유래 세포주에서는 높으나 사람 교종 세포주에서는 낮게 관찰되어 ATRA의 임상적 효용성에 의문이 제기되기도 하였다.^{22,23)} 그러나 일차 배양세포에서는 ATRA의 세포증식억제력이 높은 것으로 보고된 바,²⁴⁾ ATRA가 악성 교종의 치료제로 사용될 가능성은 여전히 존재한다.

카탈라제는 주로 세포 내 과산화체에 존재하는데 과산화체는 장쇄 지방산(long chain fatty acid) 및 다 불포화 지방산의 대사, 프로스타글란딘(prostaglandin) 및 콜레스테롤의 합성에 관여한다.^{25,26)} 따라서 카탈라제는 지방산 대사의 산물인 과산화수소(H₂O₂)를 물과 산소로 전환시키는 역할을 수행하게 된다. 본 연구에서 관찰된 바 ATRA에 의한 카탈라제의 증가는 ATRA 또는 9cRA에 의해 활성화된 RAR-RXR 또는 RXR-RXR와 결합된 PPAR에 의한 과산화체의 증식에 기인하는 것으로 추론할 수 있다. Cimini 등²⁷⁾도 사람 다형성교모세포주인 Lipari에서 ATRA에 의해 카탈라제가 증가하며 이는 PPAR감마를 매개로 한 과산화체의 증식에 의한 것임을 보고한 바 있다. 카탈라제의 활성도는 ROS가 많이 생성되는 간, 적혈구, 신장 피질 등에서 높으며, 뇌 조직에서는 낮은 것으로 보고되고 있다.²⁸⁾ Lipari와 36B10의 공통점은 다른 세포에 비해 기저 수준에서 카탈라제의 활성도가 높고, 외부 스트레스에 과산화체가 과도하게 반응하는 것으로 보이며, 이는 두 세포가 신경세포에서 과산화체의 기능 연구에 유용한 재료가 될 수 있음을 시사한다.

카탈라제는 과산화수소를 물로 전환시키므로, ROS 생성을 매개로 하는 방사선의 효과를 감소시킬 것으로 예상할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 카탈라제의 증가에도 불구하고 ATRA는 방사선감수성을 오히려 증가시켰다. 이는 ATRA에 의한 카탈라제의 증가는 방사선감수성의 저하보다는 오히려 증가시키는 기전에 관여하는 것으로 해석할 수 있다. Heck 등은 PMM 212 keratinocyte에 UVB를 조사하면 ROS의 생성이 증가하는데 카탈라제가 이 ROS 생성의 source 임을 보고한 바 있다.²⁹⁾ 이는 세포 내 ROS 청소에 관여하는 것으로 알려진 카탈라제 기능의 paradigm의 변화이다. 본 연구에서도 ATRA에 의해 카탈라제와 ROS의 증가가 동시에 관찰되었고, 카탈라제의 화학적 억제제인 ATZ에 의해 카탈라제와 ROS가 동시에 감소되는 것으로 보아 카탈라제가 ROS의 생성에 관여함을 시사하는 것이다. 한편, Heck 등은 ATZ에 의한 ROS 생성의 증가를 관찰하였으나, 본 연구에서는 ATZ에 의해 ROS의 생성이 저하되고, 세포 생존을 향상시키는 것으로 관찰되었다. 카탈라제가 catalatic 및 peroxidatic 작용을 위해서는 과산화수소가 특이적으로 결합할 수 있는 binding site가 필요하며, ATZ는 이 binding site를 불활성화시키는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾ Heck 등은 UVB에 의한 ROS의 생성이 ATZ에 의해 더욱 증가하는 이유를 카탈라제에 의한 수용액내 과산화물의 제거가 ATZ에 의해 억제되기 때문으로 설명하였다. 그러나 본 연구에서는 ATRA에 의한 ROS의 생성이 ATZ에 의해 억제되는 것으로 보아 ATZ의 알려지지 않은 다른 기능이 있을 것으로 추측된다. 따라서 카탈라제에 의한 ROS의 생성과 ATZ의 역할에 대한 보다 심도있는 연구가 필요하다.

Sanford 등³¹⁾은 사람 말초혈액에서 isotretinoin이 엑스선에 의한 염색분체의 손상을 억제한다고 보고하면서 isotretinoin이 방사선에 의해 발생된 ROS의 제거를 그 기전으로 설명하였다. ATRA가 종양세포에서는 방사선감수성을 증가시키고, 정상세포에서는 이를 감소시킨다면 치료이득계수(therapeutic gain factor)를 증가시킬 수 있는 매우 유용한 약제가 될 것이다.

결론적으로, 36B10에서 ATRA에 의한 카탈라제의 증가는 방사선감수성을 저하시키지 않고 오히려 증가시키며 이는 ROS 생성의 증가에 기인하는 것으로 판단된다. 36B10에서 ATRA에 의한 카탈라제 및 ROS의 증가는 매우 특이적인 현상으로, 본 연구 결과는 ATRA의 새로운 형태의 항증식 작용 기전 및 카탈라제의 기능을 제시한다. 레티노이드가 암의 예방 및 치료에 효과적으로 사용되기 위해서는 작용기전에 대한 보다 많은 이해와 지식이 요구된다고 하겠다.

참 고 문 헌

1. Korea central cancer registry, Ministry of health and welfare, Republic of Korea. 2002 Annual report of the korea central cancer registry. Seoul; 2003
2. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005;109:93-108
3. DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344:114-123
4. Choi DH, Kim IH, Ha SW, Chi JG. Radiotherapy results of brain astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 1988;6:163-168
5. Nam HR, Lim DH, Ahn YC, et al. The outcome of glioblastoma patients treated with surgery and radiation therapy. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2004;22:91-97
6. Yung WKA, Lotan R, Lee P, et al. Modulation of growth and epidermal growth factor receptor activity by retinoic acid in human glioma cells. *Cancer Res* 1989;49:1014-1019
7. Wang CJ, Chou MY, Lin JK. Inhibition of growth and development of the transplantable C-6 glioma cells inoculated in rats by retinoids and carotinoids. *Cancer Lett* 1989;48:135-142
8. Kaba SE, Kyritsis AP, Conrad C, et al. The treatment of recurrent cerebral gliomas with all-trans-retinoic acid (tretinoin). *J Neuro Oncol* 1997; 34:145-151
9. Phuphanich S, Scott C, Fishbach AJ, et al. All-trans-retinoic acid: a phase II radiation therapy oncology group study (RTOG 91-13) in patients with recurrent malignant astrocytomas. *J Neuro Oncol* 1997;34:193-200
10. Defer GL, Adle-Biassette H, Ricolfi F, et al. All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas; clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *J Neuro Oncol* 1997;34:169-177
11. Mayne ST, Lippman SM. Cancer prevention: retinoids, carotenoids, and micronutrients. In: DeVita VT jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers. 2005:521-536
12. Manzano VM, Puyol MR, Puyol DR, et al. Tretinoin prevents age-related renal changes and stimulates antioxidant defenses in cultured renal mesangial cells. *J Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1999;289:123-132
13. Rutz HP, Little JB. Modification of radiosensitivity and recovery from X ray damage in vitro by retinoic acid. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:1285-1288
14. Duchesne GM, Hutchinson LK. Reversible changes in radiation response induced by all-trans retinoic acid. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:875-880
15. Hoffmann W, Blase MA, Santo-Hoeltje L, Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP. Radiation sensitivity of human squamous cell carcinoma cells in vitro is modulated by all-trans and 13-cis-retinoic acid in combination with interferon-alpha. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:991-998
16. Traynelis VC, Ryken TC, Cornelius AS. Cytotoxicity of cis-parinaric acid in cultured malignant gliomas. *Neurosurgery* 1995;37:484-489
17. Vartak S, McCaw r, Dvis CS, Robbins ME, Spector AA. Gamma-linolenic acid (GLA) is cytotoxic to 36B10 malignant rat astrocytoma cells but not to 'normal' rat astrocytes. *Br J Cancer* 1998;77:1612-1620
18. Steel GG. Cell survival as a determinant of tumor response. In: Steel GG, ed. *Basic Clinical Radiobiology*. 3rd ed. London: Arnold. 2002:52-63
19. Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195:133-140
20. Wan Xs, Zhou Z, Kennedy AR. Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells. *Radiat Res* 2003;160:622-630
21. Wan Xs, Zhou Z, Ware JH, Kennedy AR. Standardization of a fluorometric assay for measuring oxidative stress in irradiated cells. *Radiat Res* 2005;163:232-240
22. Zang C, Wachter M, Liu H, et al. Ligands for PPARgamma and RAR cause induction of growth inhibition and apoptosis in human glioblastomas. *J Neurooncol* 2003;65:107-118
23. Schmidt F, Groscurth P, Dichgans J, et al. Human malignant glioma cell lines are refractory to retinoic acid-mediated differentiation and sensitization to apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:159-168
24. Bouterfa H, Picht T, Kess D, et al. Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines. *Neurosurgery* 2000; 46:419-430
25. van den Bosch H, Schutgens RB, Wanders RJ, Tager JM. Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:157-197
26. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP. Metabolic pathways in mammalian peroxisomes. *Biochimie* 1993;75:147-158
27. Cimini A, Cristiano L, Bernardo A, Farioli-Vecchioli S, Stefanini S, Ceru MP. Presence and inducibility of peroxisomes in a human glioblastoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 2000;1474:397-409
28. Marklung SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982;42:1955-1961
29. Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: Unexpected role for catalase. *J Biol Chem* 2003;278:22432-22436
30. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. New York; Oxford University Press, 1999: 105-245
31. Sanford KK, Parshad R, Price FM, et al. Retinoid protection against X-ray-induced chromatid damage in human peripheral blood lymphocytes. *J Clin Invest* 1992;90:2069-2074

Abstract

Increased Catalase Activity by All-trans Retinoic Acid and Its Effect on Radiosensitivity in Rat Glioma Cells

Hua Jin*, Ha Yeun Jeon[†], Woo-Yoon Park, M.D.[†], Won-Dong Kim, M.D.[†],
Hee-Yul Ahn, Ph.D.* and Jae-Ran Yu, M.D., Ph.D.[‡]

Departments of [†]Radiation Oncology and *Pharmacology,
Chungbuk National University College of Medicine and [‡]Medical Research Institute, Cheongju,
[‡]Department of Parasitology, Konkuk University College of Medicine, Chungju, Korea

Purpose: It has been reported that *all-trans* retinoic acid (ATRA) can inhibit glioma growing in vitro. However, clinical trials with ATRA alone in gliomas revealed modest results. ATRA has been shown to increase radiosensitivity in other tumor types, so combining radiation and ATRA would be one of alternatives to increase therapeutic efficacy in malignant gliomas. Thus, we intended to know the role of catalase, which is induced by ATRA, for radiosensitivity. If radiation-reduced reactive oxygen species (ROS) is removed by catalase, the effect of radiation will be reduced.

Materials and Methods: A rat glioma cell line (36B10) was used for this study. The change of catalase activity and radiosensitivity by ATRA, with or without 3-amino-1, 2, 4-triazole (ATZ), a chemical inhibitor of catalase were measured. Catalase activity was measured by the decomposition of H₂O₂ spectrophotometrically. Radiosensitivity was measured with clonogenic assay. Also ROS was measured using a 2, 7-dichlorofluorescein diacetate spectrophotometrically.

Results: When 36B10 cells were exposed to 10, 25 and 50 μ M of ATRA for 48 h, the expression of catalase activity were increased with increasing concentration and incubation time of ATRA. Catalase activity was decreased with increasing the concentration of AT (1, 10 mM) dose-dependently. ROS was increased with ATRA and it was augmented with the combination of ATRA and radiation. ATZ decreased ROS production and increased cell survival in combination of ATRA and radiation despite the reduction of catalase.

Conclusion: The increase of ROS is one of the reasons for the increased radiosensitivity in combination with ATRA. The catalase that is induced by ATRA doesn't decrease ROS production and radiosensitivity.

Key Words: Retinoic acid, Glioma, Radiosensitivity, Catalase