

두경부 편평세포암종세포주에서 retinoic acid가 linear-quadratic 모델을 적용한 방사선감수성과 apoptosis 유발에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실, 두뇌한국21 및 치학연구소
이은숙 · 강범현 · 허민석 · 이삼선 · 최현배 · 최순철 · 박태원

The effect of retinoic acid on radiosensitivity analyzed by linear-quadratic model and apoptosis in head and neck squamous carcinoma cell lines

Eun-Sook Lee, Bum-Hyun Kang, Min-Suk Heo, Sam-Sun Lee,
Hyun-Bae Choi, Soon-Chul Choi, Tae-Won Park

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, BK21 & Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

ABSTRACT

Purpose : To evaluate the effect of all-*trans*-retinoic acid on radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in NHOK, HEP-2 and FaDu cell lines.

Material and Methods : We measured the changes in survival fraction at 2 Gy (SF2), α and β after treatment of retinoic acid (1 μ M) prior to irradiation with doses of 2, 4, 6 and 10 Gy and correlated the radiosensitizing effect of retinoic acid with them. Also, apoptosis induction was assayed with the flow cytometry on days 1, 2, 3, 4 and 5 after irradiation (2, 10 and 20 Gy) combined with retinoic acid.

Results and Conclusion : SF2 values for NHOK, HEP-2 and FaDu cell lines were 0.54, 0.64 and 0.41, respectively and the cell line of FaDu was the most radiosensitive. For cell lines of NHOK and HEP-2, pretreatment of cells with retinoic acid resulted in a significant decrease of the SF2 values. The α/β ratios of x-ray survival curve were 8.714 (NHOK), 4.098 (HEP-2) and 11.79 (FaDu). The α/β ratio for NHOK decreased on pretreatment with retinoic acid, whereas those for HEP-2 and FaDu increased. Radiation induced apoptosis in all cell lines but, retinoic acid did not affect the apoptosis. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2001; 31 : 135-43)

KEY WORDS : apoptosis; retinoid; radiation, ionizing; radiation tolerance

서 론

구강암은 신체에서 발생하는 전체 악성종양의 4-5%¹를 차지하며, 이중 70-80% 정도가 편평세포암종으로 알려져 있다.² 수술과 항암요법 그리고 방사선치료 기술의 진보에도 불구하고, 진단 후 5년 이상 생존율은 병의 진행 정도에 따라 그 편차가 매우 심하여 초기 병소는 95%, 진행된 병소인 경우는 재발과 전이로 인해 약 10% 정도밖에 되지 않는다.³ 그러므로 예방과 조기치료가 무엇보다도 중요하다. 또한 여러 부위에서 독립적으로 암이 동시에 발생하

나, 간격을 두고 발생하는 경우도 자주 보고되고 있다.⁴

구강상피와 상기도상피세포의 적절한 분화를 위해서는 비타민 A가 필요하다. 비타민 A 부족시 점막섬모상피가 편평상피로 변화되며, 비타민 A 투여시 다시 점막섬모상피로 회복될 수 있음이 보고⁵된 이래 비타민 A에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. retinoid는 비타민 A의 유사체로서 구강을 비롯한 피부, 폐, 방광, 전립선 및 유선에서 상피조직의 암발생을 억제하며,^{6,7} 두경부 편평세포암종세포주에서도 retinoid가 세포증식을 억제하고 편평세포암종의 집락형성을 감소시키며⁸ 다세포상집락 (multicellular spheroids)의 성장을 줄인다는 보고⁹가 있다. 또한 인체를 대상으로 retinoid를 구강내 투여한 결과 구강과 기관지의 전암병소가 편평세포암종으로 이행하는 것을 예방할 수 있었다¹⁰는 실험결과가 있다. 구강상피세포의 악성전환은 흔히 편평상피세포로 분화함과 관계되며 이는 구강암의 대부분이 편

접수일: 2001년 6월 7일 채택일: 2001년 7월 13일
Corresponding Author: Soon-Chul Choi
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, 110-749, Korea
Tel) 82-2-760-3498, Fax) 82-2-744-3919
E-mail) raychoi@snu.ac.kr

편평세포암종임을 볼 때 정상 구강점막과 편평세포암종의 편평상피 분화 marker 발현은 차이가 난다. Jetten 등¹¹은 retinoic acid가 두경부 편평세포암종세포주 7종 가운데 5종에서 편평상피분화 marker 발현을 억제한다고 보고하였다. 또한 세포외기질의 분해는 종양의 침습과 전이의 필수 요소로 예후를 불량하게 하는데 이러한 분해는 주로 matrix metalloproteinase (MMP)에 의해 일어난다. retinoic acid는 흑색종세포주에서 MMP합성을 직접 억제하거나 두경부 편평세포암종세포주인 FaDu에서 MMP합성은 감소시키지 않지만 종양의 침습을 간접적으로 억제하기도 한다.¹² 또한 retinoic acid는 interferon과 병행사용시 여러 편평세포암종 세포주의 성장을 단독사용시 보다 더 많이 억제하고¹³⁻¹⁵ 인체구강편평세포암종 (FaDu) 세포주를 대상으로 interferon과 retinoic acid 병행사용이 방사선단일조사와 분할조사에 미치는 영향에 관한 실험에서 세포증식이 억제될 뿐만 아니라 세포의 방사선감수성을 더욱 증가시키기도 하였다.^{16,17} 이러한 retinoid의 정상조직과 종양조직의 성장과 분화를 조절하는 작용기전은 완전히 밝혀지지 않았으나, 갑상선/스테로이드 호르몬수용체그룹에 속하는 핵의 RA수용체 (RARs)와 retinoid X 수용체 (RXRs)에 결합하여 유전자의 전사조절활동에 관여하는 것으로 보여진다.¹⁸ 그리고, HL-60 세포주 실험과 인체유방암세포 실험에서 retinoic acid에 의한 apoptosis 유발 효과도 보고되었다.^{19,20}

방사선조사나 항암제들은 DNA 손상을 유발하여 세포주기 정지나 apoptosis와 같은 다양한 반응을 일으켜 궁극적으로 DNA 손상을 회복하도록 하거나 손상된 세포를 제거하게 된다. 이러한 세포주기 정지나 apoptosis의 작용기전에 이상이 있는 경우 종양 발생과 관계될 수 있다.²¹ apoptosis의 중심 매개체들은 세포 고유형태에 따라 약리 작용이 진행돼 각 조직들은 apoptosis와 관련된 유전자들의 발현 정도가 다양하게 나타난다고 보고되었다.²² 방사선과 retinoic acid의 세포 독성은 사용되는 retinoic acid 유형, 약물투여와 방사선 조사의 순서, 세포 형태, 방사선조사량 등에 따라 감수성이 다를 수 있으며,^{23, 24} all-trans-retinoic acid (ATRA)는 인체 유방암세포, 인체와 murine 흑색종세포, 인체 두경부 종양세포와 정상 및 변형 인체 피부 섬유모세포에서 세포의 방사선감수성을 증가시킨다.^{16,25,26}

본 연구는 retinoic acid가 여러 종양세포주에서 세포의 방사선감수성을 증가시키고 apoptosis를 유발시킨다는 보고^{20,27,28}에 기초하여 두경부 편평세포암종세포주를 대상으로 retinoic acid 투여가 linear-quadratic 모델을 적용한 방사선감수성과 apoptosis 유발에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였다. 이를 위해 정상세포(NHOK)와 두경부 편평세포암종세포주 (HEp-2, FaDu)를 대상으로 all-trans-retinoic acid 투여에 따른 방사선감수성 변화를 colony formation assay²⁹에 의한 세포생존곡선을 통해 비교하고자 하였다. 또한 방사선을 조사한 후 조사량에 따른 apoptosis 유발 여

부를 알아보고 retinoic acid만 투여한 경우와 retinoic acid 투여 후 방사선을 함께 조사한 경우의 apoptosis 유발 정도를 세포의 DNA 염색성을 이용한 유세포분석법³⁰으로 정량화하여 서로 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

건강한 성인남녀의 치은조직에서 표본을 채취하여 세포배양한 정상 인체 구강각화세포(normal human oral keratinocyte: NHOK)와 한국세포주은행에서 분양받은 인체 후두암종세포주 (HEp-2), 인체구강 편평세포암종세포주 (FaDu)를 사용하였다.

2. 세포배양

세포 및 세포배양

조직표본을 calcium 및 magnesium-free Hank's balanced salt 용액 (CMF-HBSS: Gibco/BRL, Grand Island, NY)에 담그고 3번 바꿔주었다. 상피조직만을 분리하기 위해 collagenase (type II, 1.0 mg/ml: Sigma Chemical Co., U.S.A.)와 dispase (grade II, 2.4 mg/ml: Boehringer-Mannheim, U.S.A.)를 함유한 CMF-HBSS에 90분간 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 일차 배양한 NHOK는 분리된 상피조직에서 얻어 0.15 mM 칼슘과 성장인자를 보충한 keratinocyte growth medium (KGM: Clonetics Corp., U.S.A.)에서 보존하다가 60 mm petri dish 당 1 × 10⁵ 세포를 7일간 배양한 뒤 실험에 사용하기 위해 2차 배양을 시행하였다.

HEp-2와 FaDu세포주는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, U.S.A.)과 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였고 세포배양기에서 5% CO₂ 및 37°C 조건으로 배양하였다.

3. 방사선조사와 retinoic acid 투여

1) 방사선조사군

NHOK, HEp-2 그리고 FaDu세포주를 60 mm petri dish에서 2일 동안 배양하고 방사선조사군은 Cs-137 방사선조사기 (IBL 437C, France)를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량률로 2, 10, 20 Gy를 단회 조사하였다. 배지는 방사선조사 직후와 방사선조사 3일 후 교환하였다. 대조군은 방사선조사를 하지 않았다.

2) 방사선조사와 retinoic acid 투여군

NHOK, HEp-2 그리고 FaDu세포주에 all-trans-retinoic acid (Sigma, R2625), 1 μM을 투여하여 60 mm petri dish에서 48시간 동안 배양후 방사선을 2, 10, 20 Gy 단회조사하였다.

방사선조사 직후와 3일 후 배지를 교환하면서 retinoic acid를 재투여하였다. 대조군은 retinoic acid만 투여하고 방사선조사는 하지 않았다.

4. 세포생존곡선 (cell survival curve) 조사

all-trans-retinoic acid 투여와 방사선조사를 함께 한 경우와 방사선조사만 한 경우의 성장 억제 능력을 집락형성정량 (colony formation assay)으로 분석하였다. 세포를 3-5세대에 걸쳐 배양하여 지수증식 (exponential growth)에 이르게 한 뒤 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA로 세포를 분리하여 배양액에 담가 계수하였다. 일련의 희석 과정을 통해 세포를 6-well culture plate (Falcon, Becton Dickinson, U.S.A.)에 낮은 밀도 (250-500 cells/well)로 seeding하고 방사선만 조사하는 군은 retinoic acid 투여없이 방사선만 2, 4, 6, 10 Gy를 단회 조사하였으며, retinoic acid 투여와 방사선조사를 함께 하는 군은 all-trans-retinoic acid를 1 μM 농도로 48시간전에 투여한 뒤 2, 4, 6, 10 Gy의 방사선을 단회조사하였다.

Colony를 형성하도록 14일간 배양한 뒤 세포를 methanol로 고정하고 trypan blue로 염색하였다. 광학현미경 (Olympus CK 40) 100배 비율로 관찰하여 세포가 50개 이상인 집락수를 세었다. 집락 수에 기초하여 생존세포율을 대조군에 대한 실험군의 비율로 계산하였으며 대표수치들은 방사선 조사선량에 대하여 표준비선형회귀 (standard nonlinear regression)방식에 의해 linear-quadratic (LQ) 생존곡선으로 적합시켰다. 이 과정은 큰 세포생존율 값에 상대적인 비중을 두게 되며 α와 β 매개변수는 비음수 값으로 제한하였다.

2 Gy에서의 세포생존율 (SF2)과 α와 β값 계산은 standard procedure⁵⁴에 따라 행하였으며 세포생존율과 α와 β 매개변수의 관계는 다음 식으로 나타내어 α와 β값을 구하였다. 여기서 α는 세포 생존곡선의 linear component로서 생존곡선의 초기 기울기를 나타내며, β는 세포 생존곡선의 quadratic component로서 고선량 부위에서 생존곡선이 휘어지도록 만든다.

$$\text{survival (S)} = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

5. Flow cytometric analysis

방사선조사군과 방사선조사와 retinoic acid 투여군에 대하여 각각 방사선조사 1, 2, 3, 4, 5일 후에 trypsin-EDTA로 회수한 세포를 15 ml tube에 넣고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Gibco BRL, U.S.A.)으로 세척한 후 1 × 10⁶개의 세포를 70% ethanol 5 ml로 고정한 뒤 4°C에서 약 7일간 유지했다. 원심분리하여 ethanol을 제거하고 0.1% bovine serum albumin (BSA, Amresco, U.S.A.)을 첨가한 5 ml의 PBS로 세척하였다. 각 tube당 25 μl Propidium Iodide (PI,

Sigma, Germany)/25 μl RNase (Sigma, Germany)/200 μl PBS 용액을 넣은 후 어두운 상태를 유지하면서 1시간 이내에 유세포분석기 (FAC Star plus flowcytometry, Becton Dickinson, USA)로 pre-G1기의 백분율을 구하였다.

결 과

1. 방사선감수성 평가

NHOK, HEp-2, FaDu 세포주의 세포생존곡선은 방사선조사선량이 증가함에 따라 세포생존율이 급격히 감소하는 비선형 회귀 (non-linear regression) 형태를 보였다. retinoic acid를 투여한 경우는 세포생존율이 더 떨어져 곡선의 기울기가 더 가파른 양상을 보였다 (Fig. 1).

Retinoic acid를 투여하지 않고 2 Gy의 방사선만 조사했을 경우 세포생존율이 NHOK가 0.54, HEp-2가 0.64 그리고 FaDu에서 0.41로 나타나 FaDu 세포주가 가장 방사선 감수성이 높았다. 1 μM의 all-trans-retinoic acid 투여 후 48시간 뒤에 방사선을 조사한 경우 SF2 (2 Gy에서 세포생존율) 값은 NHOK가 약 27%, HEp-2가 약 50%, FaDu가 약

Table 1. SF2 in NHOK, HEp-2 and FaDu cells exposed to 1 μM of retinoic acid

Cell lines	NHOK	HEp-2	FaDu
Irradiation only	0.54 ± 0.07	0.64 ± 0.05	0.41 ± 0.14
Irradiation + RA	0.39 ± 0.10*	0.32 ± 0.07*	0.28 ± 0.08

Survival fraction at 2 Gy (SF2) were calculated from the linear-quadratic fit of the dose-response curves. Data shown represent the mean values ± SD. p > 0.05 (n = 5) * (statistical significance)

Table 2. Changes in α and β values in NHOK, HEp-2 and FaDu cells exposed to 1 μM of retinoic acid

Cell lines	NHOK	HEp-2	FaDu
α	0.244 ± 0.064	0.168 ± 0.049	0.342 ± 0.110
β	0.028 ± 0.005	0.041 ± 0.004	0.029 ± 0.011
α/β	8.714	4.098	11.793
α	0.258 ± 0.057	0.259 ± 0.065	0.471 ± 0.020*
β	0.038 ± 0.010	0.040 ± 0.007	0.031 ± 0.002
α/β	6.789	6.475	15.193

Data were calculated from the linear-quadratic fit of the dose-response curves. Numbers shown represent the average ± SD of the α and β values. p > 0.05 (n = 5) * (statistical significance)

두경부 편평세포암종세포주에서 retinoic acid가 linear-quadratic 모델을 적용한 방사선감수성과 apoptosis 유발에 미치는 영향

31% 감소되었다(Table 1).

Table 2는 각 세포주에 대한 α 와 β 값을 나타낸 것으로 retinoic acid 투여로 인해 β 값의 변화는 크지 않으나 α 값의 변화가 커졌다. 방사선만 조사시 α 값은 NHOK가 0.244, HEp-2가 0.168, FaDu가 0.342였으며 retinoic acid 투여시 모든 세포주에서 증가하는 경향을 보였으며 특히 FaDu에서는 유의성있게 증가하였다($p > 0.05$). 방사선만 조사시 β 값은 NHOK가 0.028, HEp-2가 0.041, FaDu가 0.029였으며 retinoic acid 투여시 NHOK에서는 다소 증가하였으나 HEp

-2와 FaDu에서는 변화가 거의 없었다. 방사선만 조사시 α/β 값은 NHOK가 8.714, HEp-2가 4.098, FaDu가 11.79였으며 retinoic acid 투여시 NHOK에서는 감소하였으나 HEp-2와 FaDu에서는 증가하였다.

2. Apoptosis 유발 평가

10 Gy와 20 Gy의 방사선조사시 모든 세포주에서 대조군보다 apoptosis 유발이 증가하였다(Figs. 2-4). NHOK는

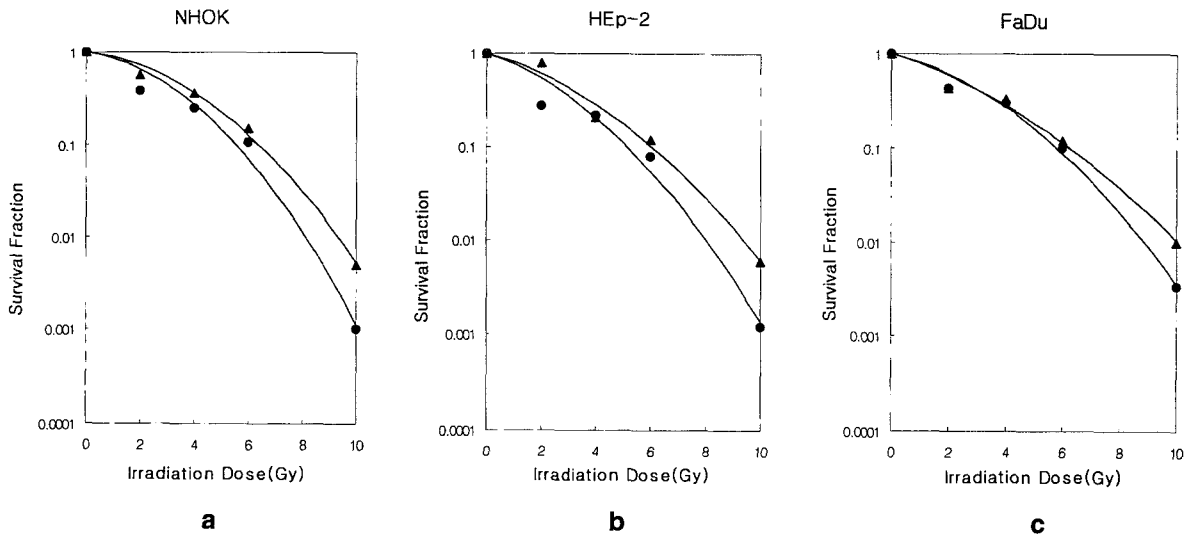


Fig. 1. Survival curve of NHOK (a), HEp-2 (b) and FaDu (c) cells untreated (▲) and treated with 1 μ M (●) all-*trans*-retinoic acid. Relative cell survival was calculated on the basis of colony-formation assay. Data were fitted to a linear-quadratic model.

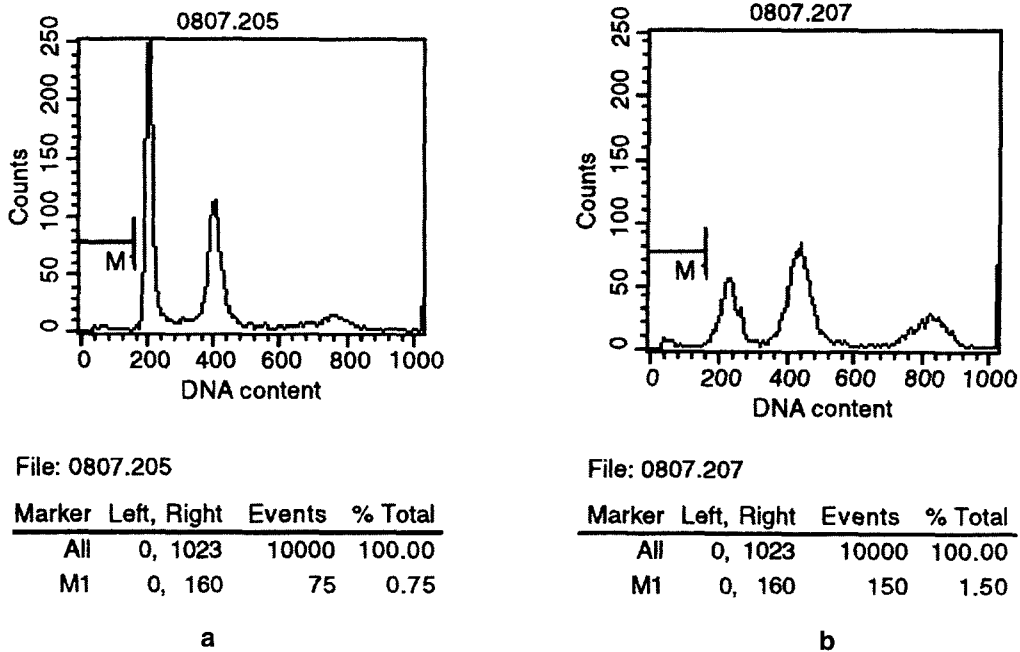


Fig. 2. Pre-G1 peak of NHOK. Cells were not irradiated (a) and were irradiated with doses of 10 Gy (b).

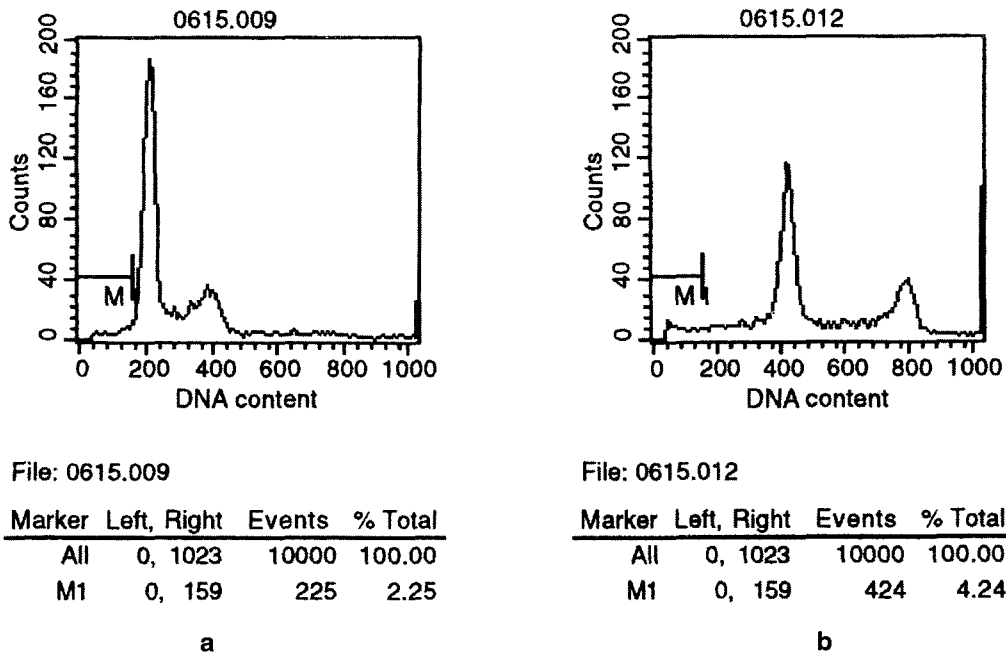


Fig. 3. Pre-G1 peak of HEP-2. Cells were not irradiated (a) and were irradiated with doses of 10 Gy (b).

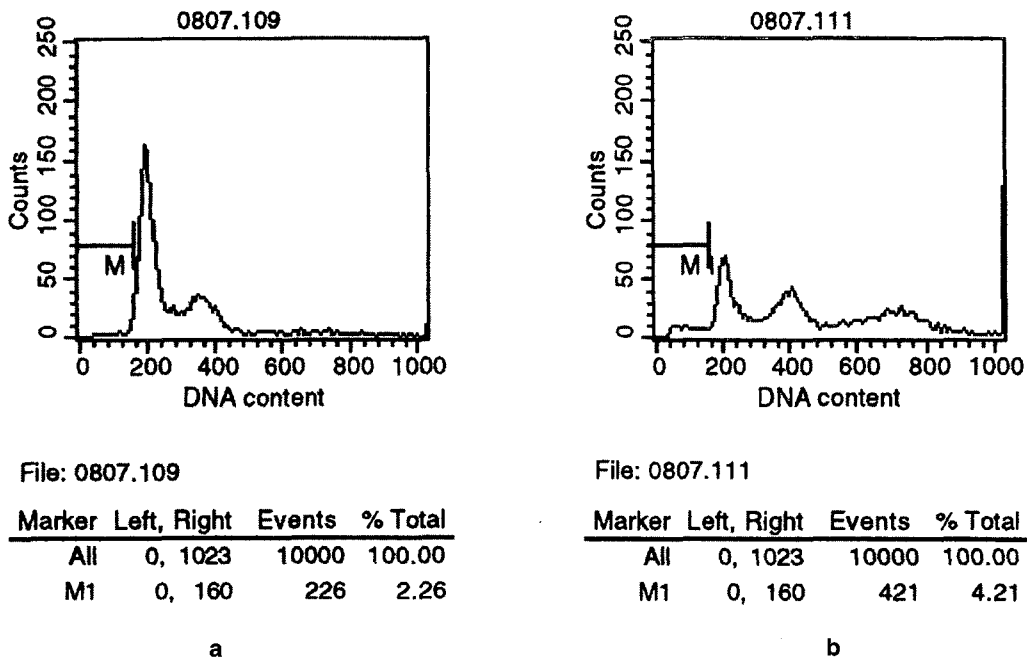


Fig. 4. Pre-G1 peak of FaDu. Cells were not irradiated (a) and were irradiated with doses of 10 Gy (b).

apoptosis 유발이 5일에 최고에 달했으며 (Fig. 5a), HEP-2 세포주는 10 Gy 방사선조사시 4일 후에 apoptosis가 최고에 이르렀고, 20 Gy 조사시에는 3일 후에 최고에 달했다 (Fig. 6a). FaDu 세포주에서는 10 Gy 방사선조사시 4일 후에 apoptosis가 최고에 달했고 20 Gy 조사시에는 5일 후에 최고에 이르렀다 (Fig. 7a).

Retinoic acid 투여로 인한 NHOK, HEP-2, FaDu 세포주의 apoptosis 유발은 없었으며, retinoic acid 투여 후 방사선을 조사한 경우에는, 조사 5일 후에 방사선만 조사한 경우에 비해 apoptosis가 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다 (Figs. 5b, 6b, 7b) Wilcoxon rank sum test ($p > 0.05$).

두경부 편평세포암종세포주에서 retinoic acid가 linear-quadratic 모델을 적용한 방사선감수성과 apoptosis 유발에 미치는 영향

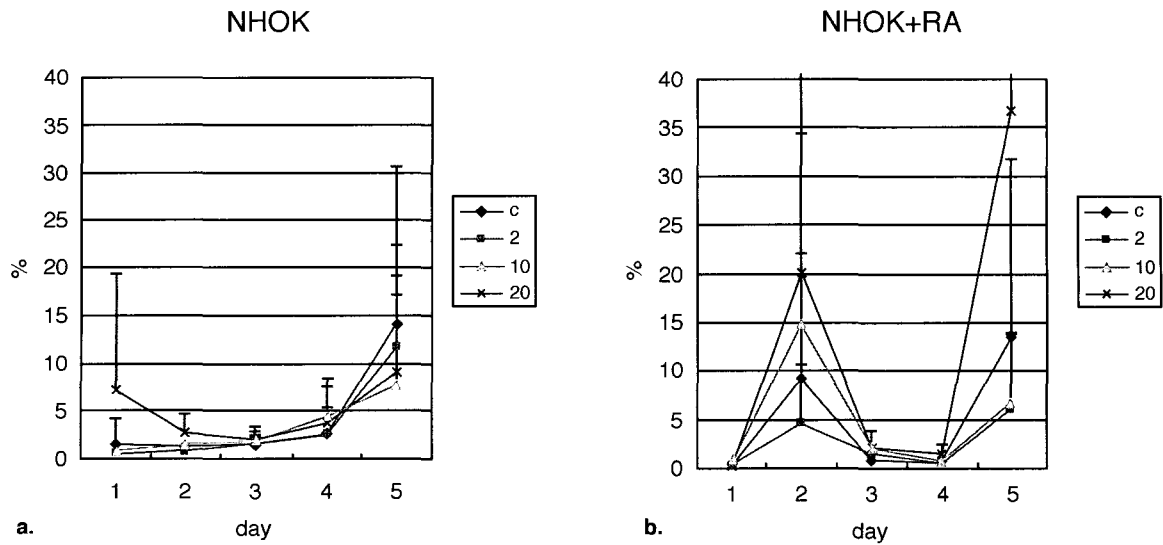


Fig. 5. Relative percentage of pre-G1 phase according to the irradiation dose on NHOK. Cells were untreated (a) and treated with 1 μM, all-trans-retinoic acid (b).

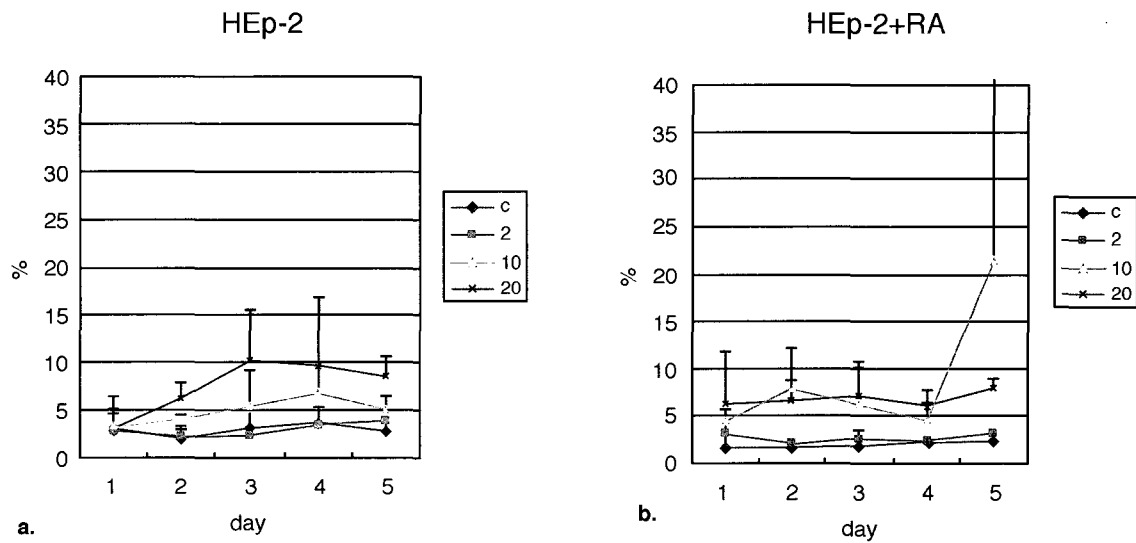


Fig. 6. Relative percentage of pre-G1 phase according to the irradiation dose on HEp-2. Cells were untreated (a) and treated with 1 μM, all-trans-retinoic acid (b).

고 찰

본 연구는 retinoic acid 투여가 두경부 편평세포암종세포주의 방사선감수성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 방사선 치료시 분할 조사선량으로 주로 이용되고 있는 2 Gy에서의 세포생존율(SF2)을 구하였다. retinoic acid를 투여하지 않고 2 Gy의 방사선만 조사했을 경우 세포생존율은 NHOK가 0.54, HEp-2가 0.64 그리고 FaDu가 0.41로 FaDu 세포주가 가장 방사선감수성이 높게 나타났다. Retinoic acid를 방사선조사 24시간 전에 투여한 경우에는 세포의 방사

선감수성에 별 영향을 주지 못한다는 보고³¹가 있어 retinoic acid는 방사선조사 48시간 전에 투여하였다. 모든 세포주에서 1 μM의 all-trans-retinoic acid(ATRA) 투여 후 방사선을 조사한 경우 SF2값이 감소되었는데 특히 HEp-2 세포주에서 50%까지 감소되어 retinoic acid 투여가 HEp-2 세포주의 방사선감수성을 크게 증가시켰음을 알 수 있었다. linear-quadratic 방정식에 의한 세포생존곡선에서 linear component인 α 는 single-hit response를 나타내고 저선량에서 주된 작용을 하여 생존곡선의 초기 기울기를 결정하며 회복할 수 없는 손상을 의미한다. quadratic component인 β

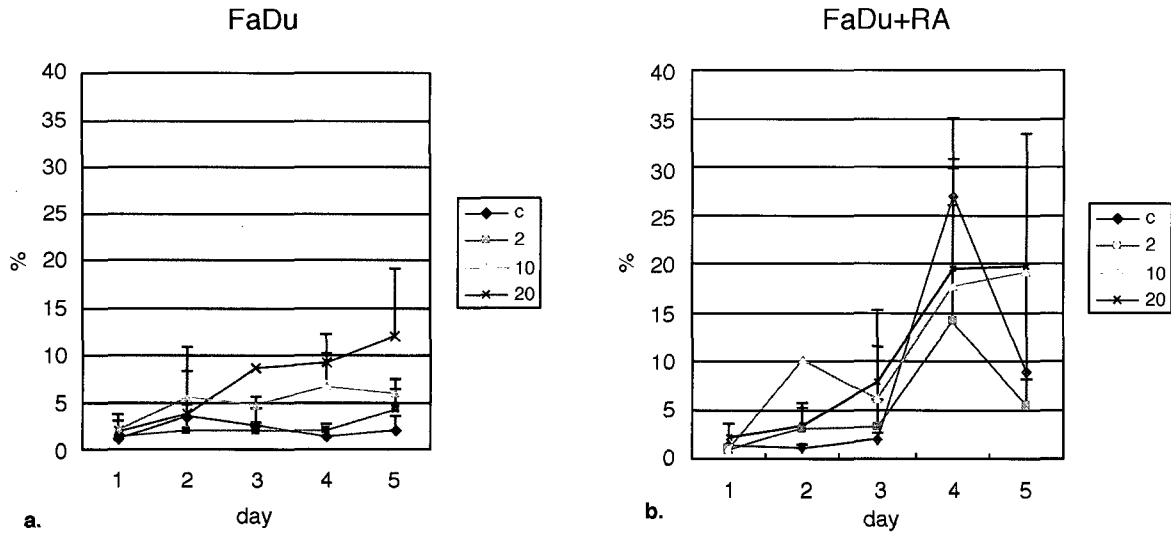


Fig. 7. Relative percentage of pre-G1 phase according to the irradiation dose on FaDu. Cells were untreated (a) and treated with 1 μ M, all-trans-retinoic acid (b).

는 고선량 부위에서 생존곡선의 bending을 일으키는 상수로서 회복할 수 있는 손상을 의미한다.³¹ retinoic acid 투여로 HEP-2, FaDu세포주의 β 값이 큰 변화가 없고 α 값이 증가한 것은 β -type 손상은 저선량 분할조사 기간동안에 회복될 수 있는 반면 α -type 손상은 저선량 방사선조사시 주로 축적되기 때문에 임상적으로 의미가 있는 저선량에서 세포독성이 증가했음을 나타낸다. 즉 retinoic acid 투여가 HEP-2, FaDu세포주에서 세포생존곡선의 초기 기울기를 결정하는 linear parameter인 α 를 증가시켰는데 이는 potentially lethal damage의 회복이 억제됨을 의미한다. 또한 세포생존곡선의 고선량부위에 영향을 주는 quadratic term인 β 는 retinoic acid 투여로 큰 변화가 없었으므로 retinoic acid 투여가 저선량 방사선조사에 대한 방사선감수성을 증가시킬 수 있는 것으로 해석된다. 또한 α/β 값이 HEP-2, FaDu세포주에서는 증가하였고 NHOK 세포에서는 감소하였는데 α/β 값이 낮은 것은 지연 반응조직에서, α/β 값이 높은 것은 급성 반응조직에서 관찰된다. 지연 반응조직은 세포증식이 느리거나 없는 반면 초기(급성) 반응조직은 빠르게 증식하는 세포에 의해 결정된다.³² 중양의 α/β 값은 대부분 늦은 반응을 보이는 정상 조직보다 높은 값을 가진다³³고 했으며 급성 반응조직이 높은 α/β 값을 가지는 것은 표적세포가 내재적으로 sublethal damage의 회복을 못하기 때문으로 보고있다.³⁴ 한편 α 와 β 값은 세포주기에 따라 값이 다양해지는데 서로 다른 세포주기에 걸쳐 세포의 방사선감수성은 달라진다. 그러므로 linear-quadratic 모델이 실험값에 잘 적합된다해도 평가된 α/β 값은 실제로는 높게 나타나는데 이것은 초기 반응조직에서 더욱 그렇다.³⁵ linear-quadratic 모델이 비교적 간단하며 실험적인 세포생존곡선

에 잘 적합하며 특히 저선량효과를 잘 기술하지만 이러한 단점도 있다.

예비 실험에서 retinoic acid 투여만으로도 HEP-2, FaDu 세포주에서 retinoic acid 비투여군보다 세포성장율이 약 25-40% 억제되었다. retinoic acid 투여 후 10일째에 세포성장 억제가 거의 한계에 도달하고 또 20일 이상 retinoic acid를 투여할 경우 세포성장 억제 수준이 더이상 증가하지 않으며 retinoic acid 투여 중단시 세포 증식이 빠르게 회복되어 며칠 내로 대조군의 세포 증식율과 같아졌다는 보고³⁶가 있다. 이것은 retinoic acid에 의한 세포 성장 억제가 apoptosis나 괴사와 같은 세포사 때문이 아니라 가역적인 cytostasis 때문으로 보여진다. 그러므로 임상적으로 retinoic acid 투여 중단시 전암 병소나 암세포가 이전 형질을 회복하여 빠르게 성장하는 암의 특징을 갖게 될 것이므로 항암 치료나 보조 요법 적용시 이러한 가능성을 고려해야 할 것이다. 또한 9-cis-retinoic acid와 13-cis-retinoic acid가 ATRA보다 몇몇 세포주에서 생물학적인 활성이 더 뛰어나 세포성장 억제율이 더 높다³⁶고 하였다. 이는 RAR이 retinoic acid와 9-cis-retinoic acid와 결합하는 반면 RXR은 9-cis-retinoic acid에만 결합하며 retinoid의 활성은 RAR과 RXR에 의해 매개되기 때문이다. 그러나, ATRA가 주로 RAR 수용체를 활성화시키지만, μ M 농도에서 약간의 ATRA는 9-cis-retinoic acid로 대사되어 RAR과 RXR 수용체 모두를 활성화시킬 수 있다.³⁷ Retinoic acid에 의한 세포 증식 억제와 방사선감수성 증가는 retinoic acid 투여 농도가 증가될수록 더욱 현저하였다. 이러한 retinoic acid의 세포 증식 억제와 방사선감수성 증가의 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나, 방사선에 의한 세포 손상의 회복을 방해하거나 세포의 최종 분화를 유도하기 때문으로 보고 있다.^{38,39} 즉 방사선조사로

인한 치명적인 손상의 복구를 방해함으로써 세포의 방사선감수성을 증가시키는 것이다. Retinoic acid 투여가 세포 생존곡선에서 α 값을 증가시키는데 이는 곧 세포의 내재적인 방사선감수성의 변화를 의미하는 것이며 세포생존율 감소를 나타낸다. 아울러 PCNA에 대한 반응성, 세포주기 분포 분석과 멜라닌 생성 등을 통해 세포증식과 분화 정도를 평가했을 때 retinoic acid가 3-5번의 세포 분열을 하며 세포를 분화시킴으로써 세포 수를 줄이고 방사선감수성이 가장 예민한 세포 분열기 비율을 증가시키기 때문으로 보고 있다.

Hoffmann 등³⁸은 세포화학적 및 형태학적 분석을 통하여 retinoic acid와 interferon 투여시 single plated enlarged cell의 수가 증가하였고 이 증대된 세포는 새로이 집락을 형성하거나 DNA 합성을 할 수 없는 비가역적 감수분열 후 상태로 세포골격 구성 역시 종양세포 특유의 미만성의 불규칙한 조직화가 아니라 좀 더 정교한 actin filament 배열이 되어 정상화된 분화상태를 보인다고 보고했다.

Keratinocyte에서 자외선이 DNA 손상을 유발함은 잘 알려져 있다. 이러한 DNA 손상이 제거되거나 즉시 회복되지 못한다면 그것은 돌연변이로 연결되어 궁극적으로 피부암이 발생할 수 있으므로 자외선에 의해 손상된 DNA의 repair 효율을 높임으로써 피부암 발생을 줄일 수 있다. 역학 조사에 의하면 retinoic acid는 자외선에 의한 피부암 발생을 억제한다고 알려져 있으나 retinoic acid가 keratinocyte에서 자외선에 의한 apoptosis를 증가시키거나 UV-damaged DNA의 회복을 촉진시키지는 않았다.⁴⁰ 조혈세포 유형과 비교시 keratinocyte (HaCaT)는 전형적인 apoptosis 유발 요인에 반응하지 않으며 retinoic acid에 의해 apoptosis가 유발되지 않는다.⁴¹ 본 실험에서도 NHOK 세포주에 retinoic acid 투여로 인한 apoptosis가 유발되지 않았으며 이는 keratinocyte가 조직의 바깥장벽으로서 수많은 내, 외부적 자극에 영향을 받기 때문에 구조적 완전성을 지키기 위해 apoptosis를 방지할 수 있는 여러 보호 기구를 가지고 있기 때문으로 추측된다. Retinoic acid의 작용기전은 완전히 밝혀지지 않았으나 핵의 retinoic acid 수용체가 retinoid의 유전자 발현에 미치는 효과를 매개하여 정상세포와 종양세포에서 성장과 분화를 변화시키는 것으로 보인다. Retinoic acid receptor (RAR)는 α , β , γ 가 있으며 RAR γ 의 과발현은 retinoic acid의 squamous differentiation을 향상시키고 성장 억제 효과를 증가시킨다.⁴² RAR β 는 유방암 세포에서 성장 정지와 apoptosis를 매개한다고 보고되었다.⁴³ Nuclear retinoid X receptor (RXR) 또한 α , β , γ 세 형태가 있으며 RAR, 비타민 D, 갑상선 호르몬과 heterodimer를 형성한다. RAR-RXR heterodimer의 상호작용기전의 한 예로서 HL-60 세포주에서 RAR-RXR heterodimer의 RAR요소가 활성화되어 세포분화관련 유전자 발현을 증가시키고 후기에는 RXR요소가 활성화되면서 apoptosis 관련 유전자의 발현을

증가시킨다는 보고가 있다.¹⁹

Retinoic acid가 인체 신경모세포주의 항암제 감수성에 미치는 영향에 관한 연구에서 retinoic acid에 의한 신경모세포의 분화가 세포 독성물질에 대한 apoptosis 감소를 일으켰는데⁴⁴ 종양 세포의 분화정도가 종양세포의 apoptosis에 대한 반응도를 나타내거나, 약물 내성발현에 기여하는 세포내 작용기전을 말하는 것으로 이는 좀더 분화된 표현형을 가지는 종양세포가 apoptosis에 저항성을 가져 생존을 유리하게 할 수도 있으며, 반면 치료 자체가 분화를 유도할 수도 있다는 것이다. 한 예로 잘 분화된 갑상선 암종에서 항암제인 etoposide나 bleomycin이 거의 효과를 나타내지 못하는 경우⁴⁵와 방사선조사가 섬유모세포와 섬유세포에서 조기 분화를 유도하는 경우를 들 수 있다.⁴⁶ 이와 반대로 HL-60 세포주에서 retinoic acid가 직접 apoptosis를 유발하는 것이 아니라 HL-60 세포의 granulocytic differentiation을 유도하여 결국 apoptosis에 이르게 하는 경우²⁸도 있다.

본 연구에서 linear-quadratic 모델을 적용하여 SF2, α , β 매개 변수의 변화를 분석한 결과 retinoic acid 투여가 두경부 편평세포암종세포주의 방사선감수성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었던 바 세포주기에 따른 영향과 relative biologic effectiveness (RBE)를 함께 적용하여 세포의 방사선감수성을 평가함이 의미있을 것으로 생각되며 이를 위해 linear-quadratic 모델 이외의 다른 분석법도 고려해 봄이 바람직할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Lee SK. Malignant tumors among Korean-relative frequency study on 19,140 cases during 1978 to 1986. J Kor Medical Science 1988; 3: 1-12.
2. 조한국. 한국인 구강암의 발생상황에 대한 병용 요법. 대한구강악안면외과학회지 1984; 22: 1087-91.
3. Fossion E, De Coster D, Elinger P. Oral cancer: epidemiology and prognosis. Rev Belge Med Dent 1994; 49: 9-22.
4. Schwartz LH, Ozsahin M, Zhang GN, et al. Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. Cancer 1994; 74: 1933-8.
5. Wolbach SB, Howe PR. Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A. J Exp Med 1925; 42: 753-7.
6. Shklar G, Schwartz J, Grau D. Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. Oral Surg 1980; 50: 45-52.
7. Pollard M, Luckert PH, Sporn MB. Prevention of primary prostate cancer in Lobund-Wistar rats by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. Cancer Res 1991; 51: 3610-1.
8. Reiss M, Pitman SW, Sartorelli AC. Modulation of the terminal differentiation of human squamous cell carcinoma cells in vitro by all-trans-retinoic acid. J Nat Cancer Inst 1985; 74: 1015-23.
9. Sacks PG, Oke V, Amos B, Vasey T, Lotan R. Modulation of growth, differentiation and glycoprotein synthesis by beta-all-trans-retinoic acid in a multicellular tumor spheroid model for squamous cell carcinoma of the head and neck. Int J Cancer 1989; 44: 926-33.
10. Huber MH, Lippman SM, Hong WK. Chemoprevention of head and neck cancer. Semin Oncol 1994; 21: 366-75.

11. Jetten AM, Kim JS, Sacks PG, et al. Inhibition of growth and squamous cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous cell carcinoma cells by β -all-*trans*-retinoic acid. *Int J Cancer* 1990; 45 : 195-202.
12. Schoenermark MP, Mitchell TI, Rutter JL, Reczek PR, Brinckerhoff CE. Retinoid-mediated suppression of tumor invasion and matrix metalloproteinase synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878 : 466-86.
13. Frey JR, Peck R, Bollag W. Antiproliferative activity of retinoids, interferon and their combination in five human transformed cell lines. *Cancer Lett* 1991; 57 : 223-7.
14. Motzer RJ, Schwartz L, Law TM, et al. Interferon alfa-2a and 13-*cis*-retinoic acid in renal cell carcinoma: antitumor activity in a phase II trial and interactions in vitro. *J Clin Oncol* 1995; 13 : 1950-7.
15. Windbichler GH, Hensler E, Widschwendter M, et al. Increased radiosensitivity by a combination of 9-*cis*-retinoic acid 7 interferon- γ in breast cancer cells. *Gynecol Oncol* 1996; 61 : 387-94.
16. DeLaney TF, Afridi N, Taghian AG, et al. 13-*cis*-retinoic acid with α -2a-interferon enhances radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Res* 1996; 56 : 2277-80.
17. Gerweck LE, Zaidi ST, Delaney TF. Enhancement of fractionated-dose irradiation by retinoic acid plus interferon. *Int Rad Oncol Biol Phys* 1998; 42 : 611-5.
18. Lohnes D, Dierich A, Ghyselincx N, et al. Retinoid receptors and binding proteins. *J Cell Sci (suppl)* 1992; 16 : 69-76.
19. Nagy L, Thomazy VA, Shiply GL, et al. Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol* 1995; 15 : 3540-51.
20. Shao ZM, Dawson MI, Li XS, et al. P53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 11 : 493-504.
21. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Can Res* 1991; 51 : 6304-11.
22. Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6 : 41-4.
23. Chang AYC, Keng PC. Potentiation of radiation cytotoxicity by recombinant interferone, a phenomenon associated with increased blockage at the G2- M phase of the cell cycle. *Cancer Res* 1987; 47 : 4338-41.
24. Duchesne GM, Hutchinson LK. Reversible change in radiation response induced by all-*trans* retinoic acid. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33 : 875-80.
25. Rutz HP, Little JB. Modification of radiosensitivity and recovery from x-ray damage in vitro by retinoic acid. *J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16 : 1285-8.
26. Schiller U, Hoffmann W, Mayer C, Ulrich W, Bamberg M, Rodemann HP. All-*trans*-retinoic acid modulates the radiosensitivity and differentiation of normal and tumor cells in vitro. *Ann Oncol* 1994; 5 : 1-3.
27. Cope FO, Wille JJ. Retinoid receptor antisense DNAs inhibit alkaline phosphatase induction and clonogenicity in malignant keratinocytes. *Proc Nat Acad Sci* 1989; 86 : 5590-4.
28. Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G. The expression of 'tissue' transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death. *Europ J Cell Biol* 1991; 54 : 246-54.
29. Hoffmann W, Bamberg M, Rodemann HP. Antiproliferative effects of ionizing radiation, all-*trans*-retinoic acid and interferon- α on cultured human squamous cell carcinomas. *Radiat Oncol Invest* 1994; 2 : 12-9.
30. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13 : 795-808.
31. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The radiobiology of human cells and tissues in vitro radiosensitivity. The picture has changed in the 1980s. *Int J Radiat Biol* 1989; 56 : 525-37.
32. Denekamp J. Cell kinetics and radiation biology. *Int J Radiat Biol* 1986; 49 : 357-80.
33. Williams MV, Denekamp J, Fowler JF. A review of α/β ratios for experimental tumors: implications for clinical studies of altered fractionation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11 : 87-96.
34. Thames HD, Withers HR, Peters LJ, Fletcher GH. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: Implications for dose-survival relationships. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8 : 219-26.
35. Schultheiss TE, Zagars GK, Peters LJ. An explanatory hypothesis for early- and late-effect parameter values in the LQ-model. *Radioth Oncol* 1987; 9 : 241-8.
36. Giannini F, Maestro R, Vukosavljevic T, Pomponi F, Boiocchi M. All-*trans*, 13-*cis* and 9-*cis* retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSCC cell lines: implication for in vivo retinoic acid use. *Int J Cancer* 1997; 70 : 194-200.
37. Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans RM. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormones receptors. *Cell* 1995; 81 : 541-50.
38. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; 65 : 1097-8.
39. Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986; 7 : 115-8.
40. Li G, Bush JA, Ho VC. Effect of retinoic acid on apoptosis and DNA repair in human keratinocytes after UV B irradiation. *J Cutan Med Surg* 2000; 4 : 2-7.
41. Henseleit U, Rosenbach T, Kolde G. Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1996; 288 : 676-83.
42. Oridate N, Esumi N, Lotan D, et al. Implication of retinoic acid receptor γ in squamous differentiation and response to retinoic acid in head and neck SqCC/ Y1 squamous carcinoma cells. *Oncogene* 1996; 12 : 2019-28.
43. Seewalt VL, Joffnson BS, Perker MB, Collins SJ, Swissbelm K. Expression of retinoic acid receptor β mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 1995; 6 : 1077-88.
44. Lasorella A, Iavarone A, Israel MA. Differentiation of neuroblastoma enhances Bcl-2 expression and induces alterations of apoptosis and drug resistance. *Cancer Res* 1995; 55 : 4711-6.
45. Degroot LJ, Krieger DT, Bardin CW. Current therapy in endocrinology and metabolism: Thyroid carcinoma. BC Decker Inc: Philadelphia. 1986; 92-6.
46. Rodemann HP, Peterson HP, Schwenke K, von Wangenheim KH. Terminal differentiation of human fibroblast is induced by radiation. *Scann Micros* 1991; 5 : 1135-43.