

Investigating Effective Combinations of Anti-cancer Drugs and Radiation Therapy for Treating Non-small Cell Lung Cancer with Using Two Cell Lines

Purpose: Radiotherapy had been used for treating unresectable locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). However, the survival rate after radiotherapy alone is low and this primarily due to the failure of local disease control and distant metastasis. For achieving better disease control, radiotherapy has recently been combined with chemotherapy in various ways. In this study, we aimed to find the most effective combination of chemotherapy and radiotherapy for treating NSCLC. **Materials and Methods:** Two human lung cancer cell lines (NCI-H520 and A549) and various chemotherapeutic agents (paclitaxel, docetaxel, gemcitabine and cisplatin) were used for this study. The radiation doses were 0, 2, 4 and 8 Gy. After processing various combinations according to the radiation doses and the concentrations of the chemotherapeutic agents, cell survival was quantified by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay. For the evaluation of synergism between chemotherapy and radiotherapy, we used a combination index that as calculated by Chou and Talalay's method and with using Cal-cusyn software. **Results:** Among the various combinations of chemotherapeutic agents and radiation doses, concurrent chemoradiation therapy (CCRT) led to the highest apoptosis rate and it showed frequent synergism. When taxane was administrated as a chemotherapeutic agent, chemotherapy followed by radiotherapy was the most effective combination. When high-dose chemotherapeutic agents were added to CCRT, induction chemotherapy resulted in a higher apoptosis rate and more frequent synergism than did consolidation chemotherapy. **Conclusion:** When radiotherapy is combined with chemotherapy for treating the NCI-H520 and A549 cell lines, CCRT is the most effective combination. If a high-dose chemotherapeutic agent is added to CCRT, then induction chemotherapy is more effective than consolidation chemotherapy. (J Lung Cancer 2009;8(1):21-30)

Key Words: Non-small cell lung carcinoma, Concurrent chemoradiation, Induction chemotherapy

In-Jae Oh, M.D., Ph.D.¹
Hyun-Ju Cho, M.S.¹
Tseden-Ish Manaljav, M.S.¹
Yong-Soo Kwon, M.D., Ph.D.¹
Kyu-Sik Kim, M.D., Ph.D.¹
Sung-Chul Lim, M.D., Ph.D.¹
Young-Chul Kim, M.D., Ph.D.¹
and Sung-Ja Ahn, M.D., Ph.D.²

Departments of ¹Internal Medicine,
²Radiation Oncology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Received: May 20, 2009
Accepted: June 10, 2009

Address for correspondence
Young-Chul Kim, M.D., Ph.D.
Lung and Esophageal Cancer Clinic,
Chonnam National University Medical School, Hwasun Hospital, 160, IIsim-ri, Gwangju 519-809, Korea
Tel: 82-61-379-7614
Fax: 82-61-379-7619
E-mail: kyc0923@chonnam.ac.kr

This study was supported by Chonnam National University Grant 2005-0699.

서 론

진단 당시 35~45%에 해당하는 III병기 비소세포 폐암 중 절제가 불가능한 IIIB병기의 치료는 주로 방사선 요법이 시행되어 왔으나 방사선 단독 요법으로는 5년 생존율이 10% 미만으로 좋지 못하다. 그 이유는 국소 종양의 제어가 어려울 뿐 아니라 진단 당시 영상 검사로는 발견하기 어려운 미세전이(micrometastasis) 암세포가 존재하여 폐에 국한된

방사선 요법을 시행한 후 원격 장기에서의 재발을 초래하는 경우가 있기 때문이다. 이 원격 장기에서의 재발을 막기 위해 다양한 방법으로 항암화학요법이 방사선 치료에 병합되고 있고 이러한 병합 치료가 방사선 단독 치료보다 우수함이 밝혀지고 있다. 최근에는 병합할 때 시간 간격을 두는 순차적 항암화학방사선치료(sequential chemoradiation therapy, SCRT) 보다는 동시항암화학방사선치료(concurrent chemoradiation therapy, CCRT)가 선호되고 있다(1).

CCRT에 대해 아직 정립되지 않은 부분들에 대해 활발히 연구가 진행되고 있는데, 대표적인 것이 CCRT와 추가적인 고용량의 항암화학요법과의 병합 시기에 관한 연구(2,3)와 어떠한 약제를 CCRT에 이용할 것인가이다. 국내에서도 paclitaxel + cisplatin, docetaxel + cisplatin, gemcitabine + cisplatin 세 가지 병용 처방을 비교한 연구가 있다(4). 임상연구 뿐 아니라 세포주를 이용한 실험실 연구로 치료 효과를 입증하기 위한 노력들 또한 활발히 진행되고 있다(5-10).

저자들은 항암화학요법과 방사선 치료의 기초적인 실험실 연구로서 폐암 세포주를 이용하여 다양한 항암 약제들과 방사선 선량을 병합하여, 병합 방법에 따른 치료 효과의 차이를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 세포주와 배양

사람의 폐암 세포에서 유래한 편평상피세포암 세포주인 NCI-H520, 선암 세포주인 A549를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 5% fetal calf serum (FCS), penicillin (0.02 UI/mL), streptomycin (0.02 µg/mL), glutamine (2 mM), non-essential amino acids (1%)의 배양액으로 37°C 5% CO₂상태에서 계대배양 하였다. 실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, 배양용기(12-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, CA, USA) 제품을 사용하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

2) 항암제 및 방사선 조사

항암 약제는 paclitaxel (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA), 에탄올에 녹여 -20°C에 보관 후 배양액에 희석한 docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France), gemcitabine (Eli-Lilly, Indianapolis, IN, USA), cisplatin (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA)을 사용하였다.

방사선 조사는 선형 가속기(Varian Co., Palo Alto, CA, USA) 6 MV를 이용했고 배양용기 내에 세포주를 배치한 상태에서 방사선을 조사하였다. 방사선 선량은 각각 0, 2, 4, 8 Gy로 하였다.

3) 세포주 배양 및 시약처리

NCI-H520, A549 세포주를 37°C 5% CO₂배양기에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI1640 배양액으로 배양하여, 24 시간 간격으로 배양액을 교체한다. Log phase에 있는 세포주에 paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, cisplatin을 농도 별로 처리, 각 약물에 대한 세포독성 실험을 시행하여 각각의 약제에 대한 세포 생존율을 측정하였다. 방사선에 대해서도 0, 2, 4, 8 Gy를 조사 후 각각에 대한 세포 생존율을 측정하였다. 각각의 항암 약제와 다양한 방사선량을 동시에 조사했을 때 얻어진 세포 생존율이 50%에 이를 때까지 실험을 진행하였다.

4) 세포 생존율 측정(MTT assay)

세포(4,000 cell/well)는 세포 배양판(12-well plate)에 분주하여 12시간 이상 CO₂배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, MTT 용액(5 mg/mL in PBS)을 배양액 최종 부피의 1/10이 되게 첨가했다. 4시간 후 MTT

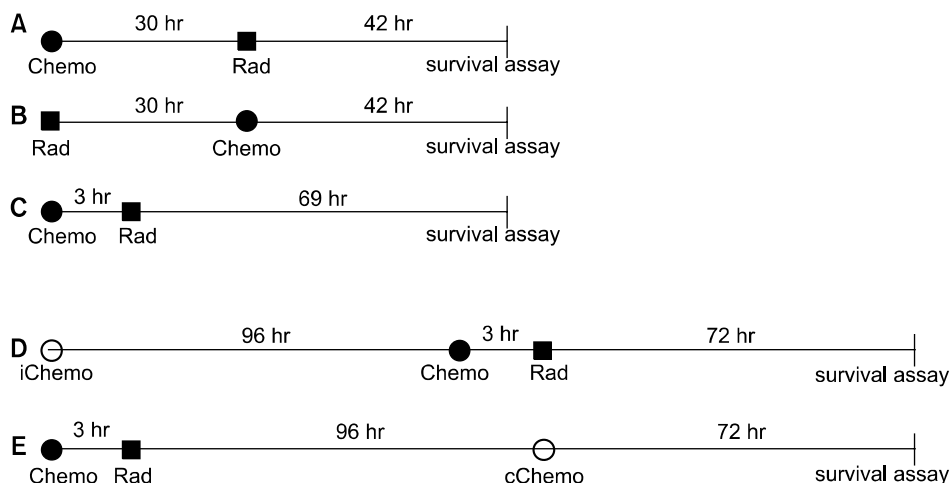


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental designs in this study. After the indicated treatment, the cells were processed for clonogenic survival using a MTT assay. Chemo: chemotherapy, Rad: radiation, iChemo: induction chemotherapy, cChemo: consolidation chemotherapy, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide.

가 들어있는 배양액을 모두 버리고 DMSO 100 μ l를 세포 배양 판에 넣고 충분히 녹인 후 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 560 nm 파장에서 흡광도로써 측정하였다. 각각의 항암 약제와 방사선량에 대해서 다양한 조합을 이루어 실험을 진행하였고, 각 농도 별로 최소 3회 이상의 반복 실험을 한 뒤 세포 생존율 값의 평균을 구했다.

5) 세포생존율의 통계학적 분석

항암 약물과 방사선 조사의 상승작용 여부는 Calcsyn software (Biosoft, Cambridge, UK)를 이용한 Chou and Talalay 방법으로 확인하였다(11-13). 항암 약제와 방사선량의 농도에 따른 combination index (CI)를 구하여 CI=1이면 부가효과(additive effect), CI>1인 경우엔 길항효과(antagonism), CI<1이면 상승효과(synergism)가 있는 것으로 판정하였다.

상승효과가 있는 경우엔 좀 더 세분하여 $1 < CI < 0.7$; 약한 상승효과(slight synergism), $0.7 < CI < 0.3$; 상승효과, $CI < 0.3$; 강한 상승효과(strong synergism)로 판정하였다.

6) Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

세포막의 apoptosis 현상을 조사하기 위해서 propidium iodide (PI)로 DNA를 염색한 후 flow cytometer를 이용하여 형광의 세기를 측정했다. 폐암세포들을 6 cm 배양판에 5×10^4 /mL개의 세포수가 되도록 분주한 후 약물을 농도 별로 처리하고 배양하였다. Cell scraper를 사용하여 분리한 세포를 배양액과 함께 모은 후 1,200 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 세포를 침전시키고 PBS 1 mL을 넣어 다시 부유시킨 후 1,200 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 세포에 70% ethanol 2 mL을 첨가하여 4°C에서 4시간 동안 고정시킨 후 phosphate-citrate buffer (0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M citrate)와 실온에서 30분 반응시켰다. RNase (0.1 mg/mL을 첨가한 후

Table 1. Sequence-dependent Antiproliferative Effects According to the Various Chemotherapeutic Agents and Radiation Doses in NCI-H520 Cell Line

Sequences			(A) ChemoRT		(B) RTchemo		(C) CCRT	
Drugs		RT (Gy)	Viability (%)	CI	Viability (%)	CI	Viability (%)	CI
Paclitaxel	10 nM	2	69.23	0.51*	93.10	1.82	59.80	0.39*
		4	60.28	0.78	77.28	1.35	61.99	0.82
		8	61.25	1.60	61.54	1.62	54.53	1.34
	25 nM	2	46.64	0.27 [†]	90.90	1.45	53.13	0.32*
		4	46.16	0.54*	83.14	1.74	57.83	0.73
		8	46.33	1.08	57.75	1.46	52.02	1.25
Docetaxel	10 ng/mL	2	56.22	0.33*	85.36	1.95	61.82	0.42*
		4	53.56	0.60*	79.56	2.28	59.13	0.75
		8	53.05	1.19	63.18	1.77	54.22	1.24
	25 ng/mL	2	42.65	0.21 [†]	65.87	0.50*	53.71	0.30*
		4	39.96	0.39*	62.89	1.87	55.23	0.64*
		8	37.03	0.70	53.90	1.22	45.97	0.93
Gemcitabine	50 ng/mv	2	84.44	0.95	92.00	1.47	75.16	0.68*
		4	80.88	1.65	70.97	1.21	59.74	0.91
		8	67.78	2.22	62.58	1.95	53.87	1.59
	100 ng/mL	2	67.74	0.55*	87.11	1.08	41.40	0.29 [†]
		4	59.06	0.90	67.94	1.11	38.52	0.56*
		8	53.23	1.57	55.30	1.64	34.76	1.02
Cisplatin	2.5 g/mL	2	42.01	0.36*	73.87	0.92	39.60	0.34*
		4	43.26	0.75	61.89	1.26	38.71	0.67*
		8	41.82	1.66	55.37	2.42	36.35	1.42
	5.0 g/mL	2	29.37	0.25 [†]	59.82	0.59*	22.78	0.24 [†]
		4	26.50	0.46*	46.72	0.83	26.96	0.47*
		8	25.16	1.00	42.68	1.70	26.68	1.05

(A) Chemotherapy followed by radiation, (B) radiation followed by chemotherapy, and (C) concurrent chemoradiation (CCRT). The combination index (CI) values were calculated using the Chou and Talalay mathematical model for drug interactions on Calcsyn software. A CI was equal to 1 denotes additivity; antagonism if the $CI > 1$; CI values between 1 and 0.7 indicate slight synergism; *0.7 to 0.3, synergism; [†]<0.3, strong synergism.

37°C에서 30분간 반응시킨 후 세포에 PI (50 µg/mL)을 넣고 37°C 암실에서 반응시켰다. FACS Vantage flow cytometer를 이용하여 형광의 세기를 측정하고, apoptosis를 나타내는 Sub-G1 DNA content 부분을 측정하였다.

7) 항암 약제 및 방사선 조사의 조합

(1) 항암 약제와 방사선 투여 순서에 따른 효과 비교: Fig. 1과 같이 항암제 전처리 30시간 후 방사선 조사, 42시간 후 세포 생존율 측정(sequence A), 방사선 조사 30시간 후 항암제 처리, 42시간 후 세포 생존율 측정(sequence B), 항암화학 방사선 동시투여(CCRT, 항암제 전처리 3시간 후 방사선 조사), 69시간 후 세포 생존율 측정(sequence C)을 각각 비교하였다.

(2) 유도 항암화학요법과 공고 항암화학요법의 효과 비교: 고용량의 항암제 처리 96시간 후 CCRT, 42시간 후 세포 생존율(sequence D)과 CCRT 96시간 후 고용량 항암제 처리,

42시간 후 세포 생존율(sequence E)을 비교하였다.

결 과

1) 항암제와 방사선 투여 순서에 따른 효과 비교

방사선 선량 0, 2, 4, 8 Gy와 paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, cisplatin을 각각 저농도에서 고농도로 증량시켜 가면서 병합한 후 세포 생존율이 50% 이하로 감소할 때까지 실험을 진행 한 후 동일 농도 조건 하에서 방사선과 항암 약제의 투여 순서에 따른 차이를 비교하였다. 일반적으로 방사선 선량과 항암 약제의 농도가 높을수록 세포 생존율이 저하되는 경향을 보였고, 각각을 단독으로 투여했을 때보다 병합 투여했을 경우 상승작용이 있는지 여부는 CI 값을 계산해서 판단하였다.

(1) NCI-H520 세포주: Paclitaxel, docetaxel은 항암제 전처리 후 방사선 조사를 한 군(sequence A)이 가장 세포 생존율

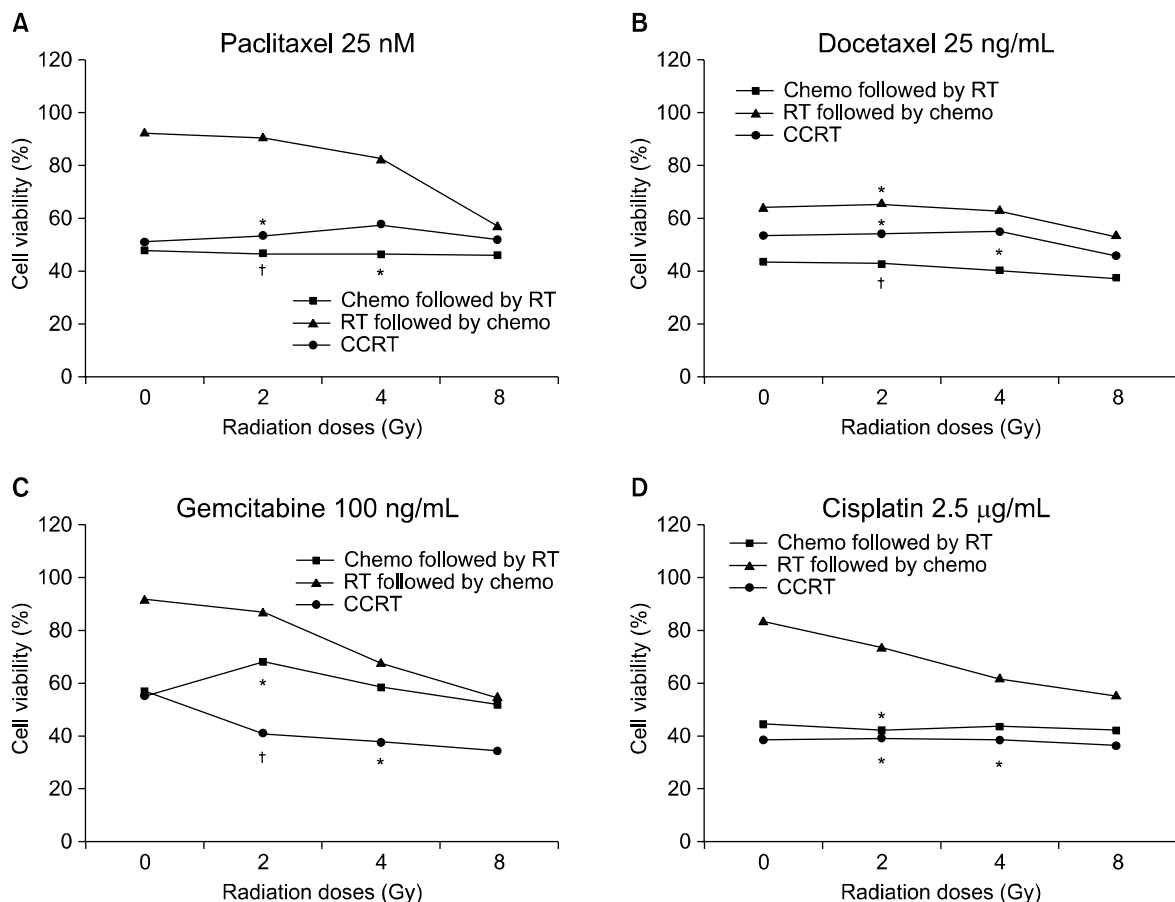


Fig. 2. Sequence-dependent antiproliferative effects at various concentrations of chemotherapeutic agents in the NCI-H520 cell line. The cell viabilities are shown on (A) paclitaxel 25 nM, (B) docetaxel 25 ng/mL, (C) gemcitabine 100 ng/mL, and (D) cisplatin 5 g/mL, respectively. *synergism (CI values of 0.7 to 0.3), †strong synergism (CI values less than 0.3).

이 낮게 보였고, CCRT (sequence C), 방사선 투여 후 항암 약제 투여(sequence B) 군의 순서였다(Table 1, Fig. 2). 특히 방사선 투여 후 항암 약제 투여했을 때는 $CI > 1$ 로서 모두 길항효과를 보였다. 항암제 전처리 후 방사선 조사한 군과 CCRT군에서는 방사선 2 Gy로 낮은 용량 투여 시 모두 상승효과를 보였고, 8 Gy 농도에서는 세포 생존율이 가장 낮았으나 길항효과를 보였다.

Gemcitabine, cisplatin을 방사선과 병합했을 때 CCRT군이 세포 생존율이 가장 낮았다. 그 다음은 항암제 전처리 후 방사선 조사한 군이었다. 방사선을 먼저 투여한 군은 모두 길항효과를 보였다. CCRT에서는 2, 4 Gy 방사선 조사한 경우 상승효과를 보였고, 8 Gy 조사한 경우엔 길항효과를 보였다.

강한 상승효과는 CCRT군과 항암제 전처리 후 방사선 조사한 군의 경우 모두 항암 약제 농도는 고용량이었고, 반대로 방사선 선량은 2 Gy로 저용량을 병합했을 때 나타났다.

(2) A549 세포주: Docetaxel은 항암제 전처리 후 방사선 조사를 한 군(sequence A)이 가장 세포 생존율이 낮게 보였고, gemcitabine에서는 CCRT (sequence C)군이 가장 낮았으며, paclitaxel, cisplatin은 두 가지 순서 모두 비슷한 세포 생존율을 보였다(Table 2, Fig. 3). 방사선 투여 후 항암 약제 투여한 군은 $CI > 1$ 로서 모두 길항효과를 보였고 CCRT군과 항암제 투여 후 방사선 조사한 군에서 상승효과를 보였다. Gemcitabine 고용도에서는 모든 방사선 선량에 대해서 상승효과를 보여 네 가지 항암 약제 중 가장 방사선 감작력이 우수하였다. 다른 항암 약제의 경우는 방사선 2, 4 Gy로 낮은 용량 투여 시 상승효과 또는 강한 상승효과를 보였다.

Flow cytometry를 이용한 세포 주기 분석 결과 apoptosis를 나타내는 sub G1 DNA 양은 CCRT군에서 가장 높게 관찰되었고 이는 모든 항암 약제에서 마찬가지였다(Fig. 4). 특히 gemcitabine 2.5 ng/mL과 4 Gy 방사선 선량을 병합했을 때는 다른 병합 방법과의 차이가 크게 나타났다.

Table 2. Sequence-dependent Antiproliferative Effects According to the Various Chemotherapeutic Agents and Radiation Doses in the A549 Cell Line

Sequences			(A) ChemoRT		(B) RTchemo		(C) CCRT	
Drugs		RT (Gy)	Viability (%)	CI	Viability (%)	CI	Viability (%)	CI
Paclitaxel	5 nM	2	79.57	1.25	78.50	1.18	63.66	0.61*
		4	57.01	0.95	68.38	1.47	58.39	1.00
		8	45.80	1.27	54.81	1.75	42.09	1.11
	10 nM	2	52.05	0.40*	78.22	1.16	53.88	0.42*
		4	48.63	0.70*	59.95	1.06	47.71	0.68*
		8	42.32	1.12	42.75	1.14	33.78	0.81
Docetaxel	2.5 ng/mL	2	62.82	0.32*	79.51	0.68*	65.67	0.36*
		4	61.48	0.61*	70.46	0.87	61.10	0.60*
		8	47.43	0.80	63.30	1.42	57.06	1.13
	5.0 ng/mL	2	40.58	0.14 [†]	73.06	0.49*	61.30	0.30*
		4	38.64	0.27 [†]	68.17	0.49*	52.71	0.44*
		8	28.34	0.38*	61.27	1.32	49.53	0.86
Gemcitabine	2.5 ng/mL	2	63.65	0.45*	74.86	0.73	62.49	0.43*
		4	59.75	0.78	71.33	1.24	50.50	0.56*
		8	52.90	1.37	65.57	2.21	43.73	0.99
	5.0 ng/mL	2	38.69	0.18 [†]	66.82	0.51*	48.00	0.26 [†]
		4	43.26	0.43*	71.98	1.28	47.37	0.50*
		8	34.46	0.70	50.06	1.24	28.32	0.54*
Cisplatin	1.0 g/mL	2	67.61	0.62*	81.12	1.12	64.04	0.55*
		4	63.78	1.09	77.94	1.91	63.43	1.07
		8	59.76	2.18	76.50	4.09	57.81	2.04
	2.5 g/mL	2	40.16	0.25 [†]	65.03	0.57*	42.58	0.27 [†]
		4	39.12	0.48*	64.70	1.12	40.25	0.50*
		8	41.93	1.22	62.37	2.38	33.68	0.92

(A) Chemotherapy followed by radiation, (B) radiation followed by chemotherapy, and (C) concurrent chemoradiation. The combination index (CI) values were calculated using the Chou and Talalay mathematical model for drug interactions on Calcsyn software. A CI was equal to 1 denotes additivity; antagonism if the $CI > 1$; CI values between 1 and 0.7 indicate slight synergism; *0.7 to 0.3, synergism; [†] < 0.3, strong synergism.

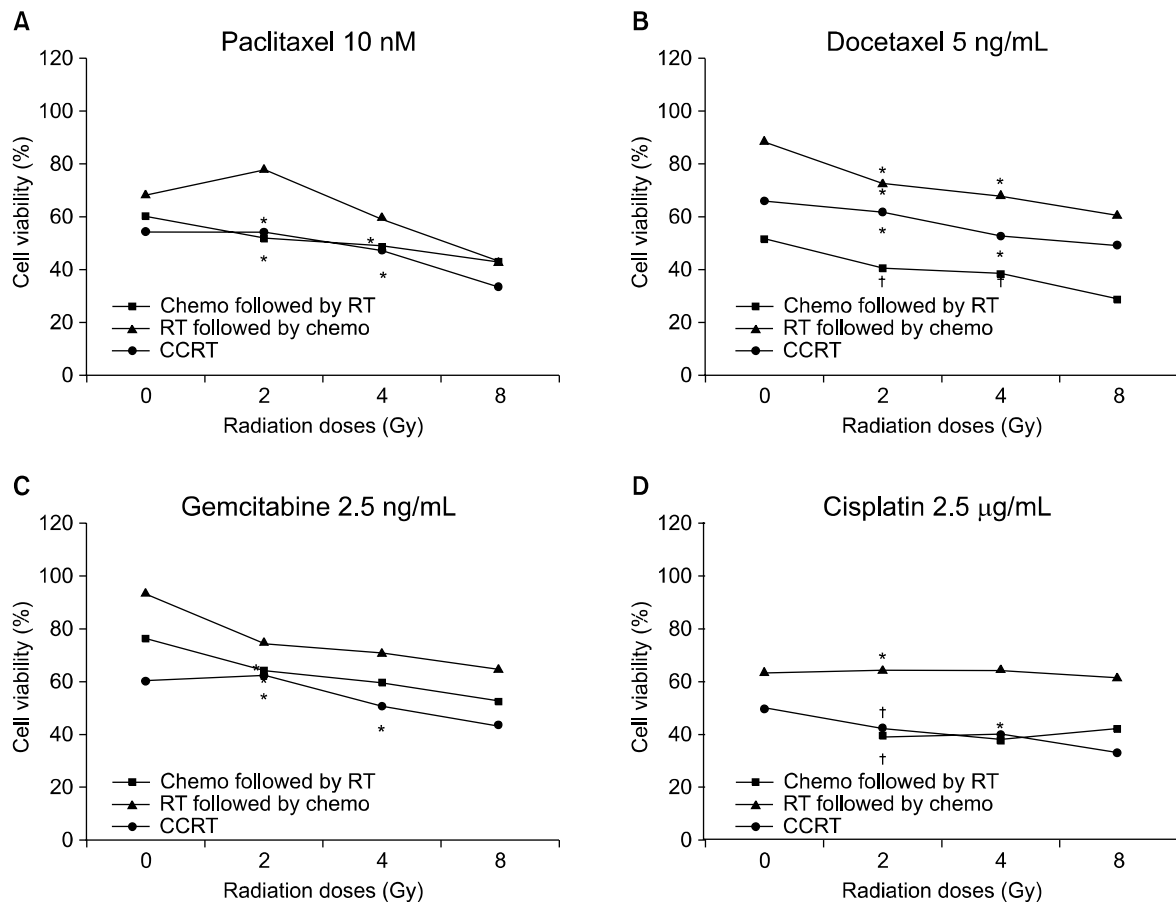


Fig. 3. Sequence-dependent antiproliferative effects according to the various concentrations of chemotherapeutic agents in the A549 cell line. The cell viability is shown on (A) paclitaxel 10 nM, (B) docetaxel 5 ng/mL, (C) gemcitabine 2.5 ng/mL, and (D) cisplatin 2.5 g/mL, respectively. *synergism (CI values of 0.7 to 0.3), †strong synergism (CI values less than 0.3).

2) 유도 화학요법과 공고 화학요법의 효과 비교

선행 실험에서 CCRT 하였던 세포주에 추가적으로 고용량의 항암 약제를 CCRT의 전후에 추가로 투여하여 유도 또는 공고 항암화학요법이 CCRT 단독 치료보다 효과적일지에 대해 알아보았다. 추가 병합하는 항암 약제는 방사선 조사와 병합했던 항암 약제 용량보다 2배 또는 3배 이상 높은 고용량을 사용하였다.

(1) **NCI-H520 세포주:** Paclitaxel 5 nM 또는 docetaxel 1 ng/mL과 방사선량 2, 4 Gy 병합치료 전 3배 농도의 유도 항암화학요법을 추가한 군에서는 모두 상승효과를 보였는데 반해, 공고 항암화학요법으로 추가한 군에서는 방사선량 2 Gy에서만 상승효과가 있었다(Table 3). Gemcitabine 50 ng/mL 투여 시에는 유도 및 공고 항암화학요법 모두 방사선량 2 Gy에서만 상승효과를 보였다. Cisplatin 0.5 g/mL 투여 시에는 유도 항암화학요법에서 보다는 오히려 공고 항암화학요법에서 전 방사선량에 대해 상승효과를 보였다.

이상과 같이 cisplatin을 제외한 대부분의 항암 약제에서 유도 항암화학요법을 추가했을 때 공고 항암화학요법 보다 상승효과의 빈도가 높았다. 이런 차이는 docetaxel에서 가장 두드러져서 유도 항암화학요법 군에서는 강한 상승효과까지 보였으나 공고 항암화학요법 군에서는 상승효과가 거의 관찰되지 않았다. 방사선량이 8 Gy군에서는 공고 항암화학요법으로 cisplatin을 투여했을 때를 제외하고는 상승효과를 관찰할 수 없었다.

(2) **A549 세포주:** NCI-H520 세포주와 비슷하게 유도 항암화학요법에서 공고 항암화학요법 보다 상승효과를 더 많이 관찰할 수 있었다(Table 4). 특히 paclitaxel은 유도 항암화학요법의 모든 농도에서 상승효과를 보였으나 공고 항암화학요법에서는 2 Gy에서만 상승효과를 보였을 뿐 다른 농도에서는 모두 길항효과를 보였다. Docetaxel, gemcitabine, cisplatin 군에서는 대부분 2 Gy에서는 상승효과를, 8 Gy에서는 길항효과를 보였고, 유도 항암화학요법 군에서 공고

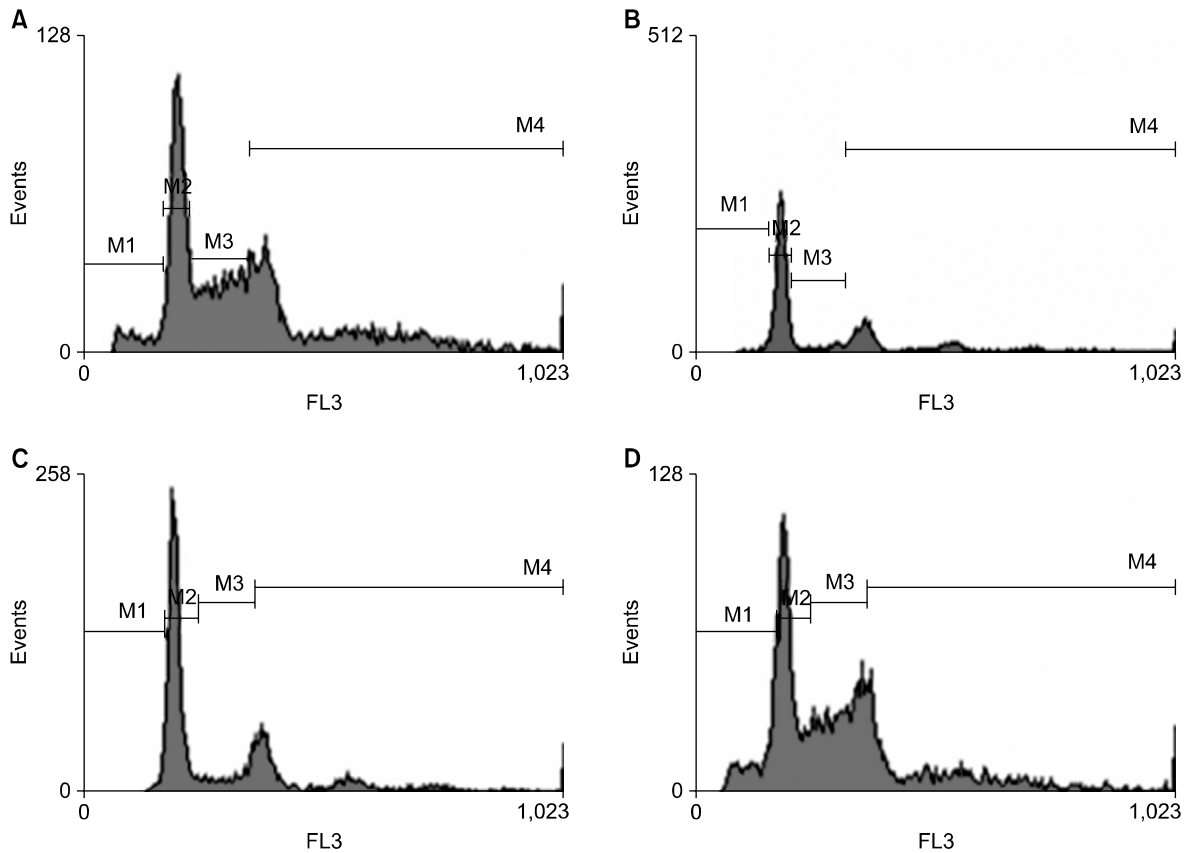


Fig. 4. Flow cytometry analysis of the cell cycle on the A549 cell line. Among (A) only gemcitabine 2.5 ng/mL, (B) radiation 4 Gy followed by gemcitabine 2.5 ng/mL, (C) gemcitabine 2.5 ng/mL followed by radiation, and (D) CCRT with gemcitabine, the greatest apoptotic peak is shown in CCRT. M1: sub G1-phase, M2: G1-phase, M3: S-phase, M4: G2/M-phase.

항암화학요법 보다 상승효과를 보인 빈도가 높았다. NCI-H520 세포주와는 달리 강한 상승효과는 관찰되지 않았다.

고안 및 결론

국내의 폐암 사망률은 2000년에 10만 명 당 약 25명으로 이미 암 사망률 1위의 질환이 되었고(14) 현재 흡연 인구의 약 10%에서 폐암이 발생된다고 하면 획기적인 치료가 나오기 전까지 우리나라의 폐암 사망률은 더욱 증가하여 현재의 2배 이상까지 증가할 것으로 예상된다. 폐암의 상당 부분을 차지하는 III병기 비소세포 폐암의 가장 효과적인 치료로 방사선 조사와 항암화학요법을 병합하는 CCRT에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데 최근에는 가장 효과적인 치료의 병합 방법을 찾는 것이 관심의 초점이 되고 있다. CCRT에서 방사선 치료의 효과를 배가시키기 위해 병합되는 단독 항암제로는 cisplatin이 이미 그 효과를 인정받았고 carboplatin의 경우는 아직 논란의 여지가 있다. 그 외에

paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, vinorelbine 등의 약제가 platinum과 병합해서 사용했을 때 효과가 개선된다는 보고가 있다(2,6).

본 연구에서는 비소세포 폐암의 대부분을 차지하는 편평상피암과 선암의 일부를 대변할 수 있는 NCI-H520 세포주와 A549 세포주를 이용해서 여러 항암 약제들과 방사선 선량을 병합하여 실험한 결과 CCRT의 효용성을 다시 한번 확인할 수 있었다. 항암 약제의 농도와 방사선 선량을 증가시킬수록 세포 생존율은 점차로 낮아지겠지만, 두 치료를 병합했을 때 상승효과를 얻기 위해서는 항암 약제는 고농도로, 방사선 선량은 낮은 농도로 병합하는 것이 좋을 것으로 생각된다. Table 1과 2에서 보이는 것처럼 방사선 선량이 8 Gy 이상의 고용량일 때는 세포 생존율은 가장 낮았으나, CI>1로서 오히려 길항효과를 보여 효과적인 조합은 아닌 것으로 생각된다. 실제 임상에서도 방사선 치료의 독성을 줄이기 위해 분할 방사선 조사를 함으로써 1회 투여되는 방사선 선량을 줄이고 있는데, 항암 약제와 병합할 경우엔 높은 선량 보다는 낮은 선량을 병합하는 것이 항암 약제와

Table 3. Comparison of the Induction and Consolidation Chemotherapy with CCRT in the NCI-H520 Cell Line

Sequences		High-dose conc.	(A) Induction chemotherapy		(B) Consolidation chemotherapy	
Drugs	RT (Gy)		Viability (%)	CI	Viability (%)	CI
Paclitaxel 5 nM	2	+ 10 nM	64.06	1.04	58.45	1.17
	4		49.67	0.90	38.69	1.33
	8		44.15	1.18	36.97	2.04
	2	+ 15 nM	56.68	0.66*	35.49	0.61*
	4		44.13	0.67*	27.60	0.94
	8		41.51	1.04	24.91	1.37
Docetaxel 1 ng/mL	2	+ 2 ng/mL	59.86	0.27 [†]	74.08	1.12
	4		65.66	0.66*	56.32	1.40
	8		51.94	0.85	54.23	2.22
	2	+ 3 ng/mL	57.18	0.25 [†]	53.78	0.66*
	4		59.95	0.54*	43.58	1.03
	8		52.70	0.87	40.81	1.61
Gemcitabine 50 ng/mL	2	+ 100 ng/mL	62.56	0.55*	59.11	0.72
	4		55.90	0.87	63.49	1.61
	8		49.21	1.25	58.28	2.38
	2	+ 150 ng/mL	49.76	0.36*	29.60	0.36*
	4		50.90	0.74	37.96	0.88
	8		42.99	1.03	25.88	1.06
Cisplatin 0.5 g/mL	2	+ 1.0 g/mL	48.19	0.37*	50.49	0.71
	4		48.39	0.74	42.73	0.71
	8		38.52	0.72	39.82	1.00
	2	+ 1.5 g/mL	48.26	0.37*	41.43	0.39*
	4		47.07	0.67*	37.36	0.47*
	8		38.35	0.71	32.87	0.65*

(A) High-dose induction chemotherapy followed by CCRT, (B) CCRT followed by high-dose consolidation chemotherapy. The combination index (CI) values were calculated using the Chou and Talalay mathematical model for drug interactions on Calcsyn software. A CI was equal to 1 denotes additivity; antagonism if the CI > 1; CI values between 1 and 0.7 indicate slight synergism; *0.7 to 0.3, synergism; [†]<0.3, strong synergism.

의 상승효과를 기대할 수 있다고 생각된다. CCRT의 효과는 MTT assay를 통해 측정한 세포 생존율 뿐 아니라 flow cytometry를 통한 분석에서도 다른 병합 방법에 비해 효과적임이 증명되었다.

CCRT 뿐 아니라 항암 약제 전 처치 후 방사선 조사를 했을 때도 CCRT와 비슷하게 세포 생존율과 상승효과를 보이는 것으로 보여, 순차적인 치료를 할 경우 항암화학요법을 먼저 시행한 후 방사선 치료를 하는 것이 반대의 경우보다 효과적일 것으로 생각된다. 즉, 특정 세포주기에만 작용하는 항암화학요법을 먼저 시행하고 남아있는 종양세포에 대해 세포주기에 상관없이 작용하는 방사선 치료를 추가하는 것이 반대의 병합보다 효과적이라는 것이다. 특히 이런 경향은 docetaxel, paclitaxel 에서 두드러졌고, gemcitabine에서는 두 세포주 모두에서 CCRT가 가장 상승효과를 보였다. 두 세포주 중에서는 A549 세포주에서 50% 세포 생존율에 이르게 하는 항암 약제 및 방사선 선량의 농도가 낮아 치료에 대한 민감도가 더 높았는데, 이는 일반적으로 선암이 편

평상피암보다 치료에 반응이 좋은 것과 일치하는 결과이다.

CCRT 치료의 효과를 더 높이기 위해 고용량의 항암화학요법을 유도 또는 공고요법으로서 CCRT 전후에 추가하고 있으나 어떤 것이 더 효과적인지에 대해서는 아직 논란 중이다. 본 실험에서는 유도 항암화학요법을 CCRT에 추가하는 것이 공고요법 보다 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 즉, CCRT에 추가로 고용량의 항암 약제를 병합할 때는 CCRT 전에 병합하는 것이 더 효과적이라는 것이다. 물론 실험 디자인상 유도 항암화학요법 이후 96시간만 소요된 시점에서 CCRT가 추가적으로 시행되었기 때문에 고용량의 항암 약제에 의해 세포가 너무 많이 고사된 결과일 수도 있을 것이다. 특기할 사항은 오히려 CCRT 이후에 공고 항암화학요법을 추가했을 경우 cisplatin을 제외하고는 많은 농도에서 길항효과가 나타났다는 것이다. 특히 방사선 선량이 8 Gy였을 때는 대부분 길항효과를 보였다. 이는 CCRT 당시 고용량의 방사선 선량이 투여 되었다면 공고 항암화

Table 4. Comparison of the Induction and Consolidation Chemotherapy with CCRT in the A549 Cell Line

Sequences		High-dose conc.	(A) Induction chemotherapy		(B) Consolidation chemotherapy	
Drugs	RT (Gy)		Viability (%)	CI	Viability (%)	CI
Paclitaxel 5 nM	2	+ 10 nM	78.58	0.35*	52.71	0.54*
	4		67.85	0.44*	56.04	1.20
	8		54.71	0.59*	57.76	2.05
	2	+ 15 nM	78.48	0.34*	48.16	0.47*
	4		65.79	0.41*	50.30	1.01
	8		52.09	0.54*	51.13	1.68
Docetaxel 1 ng/mL	2	+ 2 ng/mL	86.35	0.53*	78.22	0.75
	4		81.32	0.77	81.35	1.86
	8		66.14	0.84	82.33	3.40
	2	+ 3 ng/mL	84.04	0.45*	67.74	0.42*
	4		80.95	0.76	75.25	1.25
	8		64.68	0.80	75.54	2.20
Gemcitabine 2.5 ng/mL	2	+ 5 ng/mL	52.35	0.63*	40.36	0.58*
	4		43.91	0.91	39.42	1.12
	8		40.42	1.28	34.15	1.48
	2	+ 7.5 ng/mL	38.66	0.37*	29.69	0.40*
	4		33.21	0.59*	26.22	0.70*
	8		26.57	0.72	24.89	1.05
Cisplatin 0.5 g/mL	2	+ 1.0 g/mL	58.57	0.50*	40.51	0.56*
	4		57.75	0.97	43.05	1.19
	8		56.89	1.56	38.39	1.67
	2	+ 1.5 g/mL	47.86	0.33*	27.61	0.38*
	4		40.97	0.50*	27.58	0.77
	8		36.83	0.71	26.62	1.17

(A) High-dose induction chemotherapy followed by CCRT, (B) CCRT followed by high-dose consolidation chemotherapy. The combination index (CI) values were calculated using the Chou and Talalay mathematical model for drug interactions on Calcsyn software. A CI was equal to 1 denotes additivity; antagonism if the CI > 1; CI values between 1 and 0.7 indicate slight synergism; *0.7 to 0.3, synergism; † < 0.3, strong synergism.

학요법을 추가하는 것이 효과적이지 않을 수 있다는 것을 시사할 수 있다.

물론 이 실험 결과만을 가지고 실제 비소세포 폐암 환자에게 적용하기엔 제한점이 있을 것으로 생각된다. 특히 CCRT는 이미 효과는 우수함이 알려져 있으나 독성 또한 심해 환자가 견디내지 못하는 경우가 많아서 수행 정도 (ECOG performance status)가 좋은 경우, 체중 감소가 심하지 않은 경우에 주로 CCRT를 행하고 있고, CCRT 전후 고용량의 항암화학요법을 추가 할 때도 환자의 전신 상태를 고려한 후 시행을 고려하고 있다. 본 연구는 폐암 세포주를 가지고 한 것이므로 이러한 독성에 대한 평가는 고려할 수 없었고 단지 세포 생존율의 저하 정도에 따른 항암 효과를 각 군 간에 비교 판정한 한계가 있다. 또 유도 및 공고 항암 화학요법으로 가정한 시험 모델이 임상 상황과 다를 수 있다는 문제도 있다. 그러나 사용되는 항암 약제의 종류 및 방사선 요법과의 병합 순서에 따라 효과의 차이가 있음을

증명함으로써 보다 효과적인 치료법을 찾아야 할 필요성을 제시한데 의의가 있다고 하겠다.

본 연구 결과를 요약하면, 항암 약제와 방사선 요법을 병합할 때는 CCRT로 하는 것이 상승효과가 컸고, taxane계 항암 약제는 CCRT도 효과적이었으나 항암제 투여 후 방사선 요법을 시행하는 것이 가장 효과적이었다. 만약 CCRT에 고용량의 항암화학요법을 추가 병합한다면 유도 항암화학요법으로서 병합하는 것이 공고 항암화학요법으로서 병합하는 것보다 더 효과적이었다.

REFERENCES

- Curran W, Scott C, Langer C, et al. Phase III comparison of sequential vs concurrent chemoradiation for patients (pts) with unresected stage III non-small cell lung cancer (NSCLC): initial report of radiation therapy oncology group (RTOG) 9410. Proc Am Soc Clin Oncol 2000;19:A1891.

2. Eberhardt W, Pöttgen C, Stuschke M. Chemoradiation paradigm for the treatment of lung cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3:188-199.
 3. Fisher MD, D'Orazio A. Concurrent chemoradiotherapy followed by consolidation docetaxel in stage IIIB non small-cell lung cancer (SWOG 9504). *Clin Lung Cancer* 2000;2:25-26.
 4. Oh JJ, Ahn SJ, Lim JH, et al. A randomized prospective trial of concurrent chemoradiotherapy(CCRT) with paclitaxel or docetaxel or gemcitabine in stage IIIB non-small cell lung cancer. *J Lung Cancer* 2007;6 Suppl II:62.
 5. Jung JH, Kim HR, Kim EJ, et al. The role of heme oxygenase-1 in lung cancer cells. *Tuberc Respir Dis* 2006;60:304-313.
 6. Lee YJ, Chung DY, Lee SJ, Ja Jhon G, Lee YS. Enhanced radiosensitization of p53 mutant cells by oleamide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:1466-1474.
 7. Loprevite M, Favoni RE, de Cupis A, et al. Interaction between novel anticancer agents and radiation in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer* 2001;33:27-39.
 8. Ryu MR, Paik SY, Chung SM. Combined effect of heptaplatin and ionizing radiation on human squamous carcinoma cell lines. *Mol Cells* 2005;19:143-148.
 9. Tsutsumi K, Yasuda M, Nishioka T. X-ray irradiation altered chemosensitivity of a p53-null non-small cell lung cancer cell line. *Cell Struct Funct* 2006;31:47-52.
 10. Zhang M, Boyer M, Rivory L, et al. Radiosensitization of vinorelbine and gemcitabine in NCI-H460 non-small-cell lung cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:353-360.
 11. Chou TC. Drug combinations: from laboratory to practice. *J Lab Clin Med* 1998;132:6-8.
 12. Chou TC. Synergy determination issues. *J Virol* 2002;76:10577; author reply 10578.
 13. Morgillo F, Martinelli E, Troiani T, et al. Sequence-dependent, synergistic antiproliferative and proapoptotic effects of the combination of cytotoxic drugs and enzastaurin, a protein kinase C β inhibitor, in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1698-1707.
 14. Bae JM, Won YJ, Jung KW, et al. Survival of Korean cancer patients diagnosed in 1995. *Cancer Res Treat* 2002;34:319-325.
-