

## C<sub>3</sub>H마우스 섬유육종에 있어서 2-Deoxy-D-Glucose가 방사선 효과에 미치는 영향 : <sup>31</sup>P-자기 공명 분광기와 유세포 분석기를 이용한 연구

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 치료방사선과학교실  
장혜숙·최은경·조정길

=Abstract=

### Effects of 2-Deoxy-D-Glucose on Radiation Response of Murine Fibrosarcoma : Observations made by In Vivo <sup>31</sup>P-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Flow Cytometry

Hyesook Chang, Eun Kyung Choi, Jeong Gill Cho,  
*Department of Radiation Oncology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center*

Since 2-Deoxy-D-Glucose(2-DDG) inhibits the glycolysis and malignant tumors have high rates of glycolysis, the potential anticancer effect of 2-DDG has been questioned. In this study, we evaluated the effect of 2-DDG on radiation response in a tumor by the growth delay assay and attempted to characterize the metabolic response and 2-DDG effects on cell cycle and proliferative capacity by means of in vivo <sup>31</sup>P-MRS and flow cytometry, respectively. 3 dimensions of tumor were measured everyday and volume was calculated from the formula  $\pi ABC/6$ . 120 animals were evenly divided for 12 treatment groups; irradiated with 0Gy, 20Gy, 30Gy, 40Gy, 50Gy and 60Gy in a single fraction with/without 2-DDG, 1gm/Kg which was injected IP 1day prior to irradiation. <sup>31</sup>P-MRS were obtained on 4th-12th day after irradiation and averaged peak area of inorganic phosphate(Pi), phosphocreatine(PCr), phosphomonoester(PME) and  $\beta$ -ATP from the tumor of different treatment groups were compared. After 2-DDG injection, growth rate of tumor slowed down. Tumor doubling time between tumor age 5-12 days was 0.84 days with slope 0.828 and tumor doubling time between tumor age 13-28 days was 3.2 days with slope 0.218 in control group. After 2-DDG injection, tumor doubling time was elongated to 5.1 days with slope 0.136. In vivo <sup>31</sup>P-MRS suggested that the rate of increase in PME and Pi by increasing size of tumor, slowed down after 2-DDG injection. Authors observed in irradiated group that 2-DDG slowed the rates of change in the ratio of Pi/ $\beta$ ATP plotted as a function of days after the treatment but 2-DDG did not affect the rates of changes in PCr and PME. Flow cytometry showed significantly increased S-

phase and G2 + M phase fraction suggesting increased proliferative capacity of tumor cells in the presence of 2-DDG but authors did not observe any significant change in cell cycle fraction for irradiated group in the presence of 2-DDG. Growth curves did not show any enhanced growth due to the addition of 2-DDG compared with that by radiation alone. Even though authors failed to observe any radiosensitizing effect of 2-DDG in this study, we felt that the findings from  $^{31}\text{P}$ -MRS were intriguing enough to warrant the further study with higher dose and different schedule of 2-DDG and radiation.

Key Word : 2-DDG,  $^{31}\text{P}$ -MRS, Radiation response

## I. 서 론

악성종양에서는 당분해 작용(glycolysis)이 정상세포에 비해 매우 높는데<sup>1</sup> 2-Deoxy-D-Glucose(2-DDG)가 당분해 경로를 방해하는 작용이 있는 것으로 알려져 있어 2-DDG가 악성종양에 대한 항암작용이 있을 것으로 생각되어 왔다.<sup>2-4</sup> 특히 방사선에 의한 DNA band의 준치사 손상의 회복에는 ATP형태의 대사 에너지 공급이 필요한데 2-DDG가 이러한 암세포의 대사 에너지원인 ATP의 생성을 억제 시킴으로써 방사선 치료의 효과를 높이는 민감제로서의 역할을 할 수 있을 것으로 생각되며 종양이 이식된 동물에 대한 생체내 실험에서 2-DDG를 방사선치료와 병용함으로써 생존률이 증가됨이 관찰되었다.<sup>5</sup> 본 실험에서는  $\text{C}_3\text{H}$  마우스에 자연 발생한 섬유육종(fibrosarcoma)을 마우스의 하지에 이식한 동물 모형을 이용하여 2-DDG가 종양의 성장에 미치는 영향과 2-DDG와 방사선치료를 병용하였을 때 2-DDG가 방사선 치료 효율에 미치는 영향을 관찰하였고 동시에  $^{31}\text{P}$ -자기공명 분광기를 이용하여 2-DDG가 종양내에서의 에너지 대사에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 또한 유세포 분석기를 이용하여 2-DDG가 종양의 세포주기와 증식 능력, 배수체에 미치는 영향을 관찰하였다.

## II. 대상 및 방법

### 1. 동물 종양 모형과 실험군

실험 동물은 생후 8주에서 12주된 체중 25-30g의  $\text{C}_3\text{Hf/Sed}$  마우스를 이용하였으며 대상 종양은

$\text{C}_3\text{Hf/Sed}$  마우스에서 발암 인자를 투여하지 않고 자연 발생하여 동종(syngeneic) 이식을 통해 유지되고 있는 제 5 세대 섬유육종(FSa II)을 대상으로 하였다. 종양을 무균적으로 채취하여 종괴를 미세절편으로 만든 후 trypsin 처리하여 단일 종양세포 혼탁액을 얻었다. Trypan blue exclusion 방법으로 활성세포의 수를 계측하여 적절한 희석 과정을 거쳐  $10^6$  개의 세포를 마우스의 우측 하지의 발등에 이식하였다. 실험군은 120마리의 마우스를 방사선 조사량에 따라 6군으로 나누고 각 군을 2-DDG 주사군과 대조군으로 나누어 각 군에 마우스 10마리를 배정하였다. 2-DDG는 마우스 체중 kg당 1g을 방사선 조사전 24시간에 주사하였고 실험 동물의 방사선 조사는 마취하지 않고 종양부위에만 국소조사가 가능하도록 특수조정기구를 제작하여 4MV 선형가속기에서 각 군에 0, 20, 30, 40, 50과 60Gy의 방사선을 일회 조사하였다.

### 2. 종양성장곡선

종양이식후 5-7일 경과하면 육안적으로 확인 가능한 크기의 종양으로 성장하는데 그때 부터 종양의 크기를 Vernier Caliper로 매일 측정하였다. 종양의 세 방향의 직경(A,B,C)을 계측하여 다음 수식에 따라 종양체적(V)을 계산하였다.

$$V = \pi ABC/6$$

매일 측정된 종양체적을 반대수용지에 표시한 후 이를 연결하여 성장곡선을 구하였다. 종양의 배가일(D)과 성장 곡선 기울기( $\lambda$ )는  $V = V_0 \exp(\lambda D)$  공식으로 구했다 ( $V = 2V_0$ ).

3. <sup>31</sup>P-자기공명 분광기(<sup>31</sup>P-MRS)

근육에 의한 자기공명 분광기의 스펙트럼 혼란을 막기 위하여 종양을 마우스의 발등에 이식하였다. <sup>31</sup>P-자기공명 분광기 스펙트럼은 1.2cm 직경의 surface coil로 측정하였다. 사용된 자기공명 분광기는 주 자장의 세기가 4.7 Tesla이고 magnet의 내경이 30cm animal system인 Bruker Biospec 4.7/30 (Zurich, Switzerland)이었고 surface coil은 31-Phosphorous에 81.049 MHz에서 조절하여 사용하였다. 한 실험에 1024 scanning이 이루어져 평균 17분의 scanning 시간이 걸렸다. 자기공명 분석기의 스펙트럼을 측정하는 동안은 nembutal 50mg/kg나 thiopental 50mg/kg를 복강내 투입하여 동물을 마취하였다. 종양 성장 실험에는 종양 이식후 9일에서 28일까지, 종양체적 60mm<sup>3</sup>와 1500mm<sup>3</sup> 사이의 마우스를 사용하여 스펙트럼을 얻었고 방사선 치료 후의 변화를 위한 실험은 방사선 조사 후 4일과 12일에 스펙트럼을 얻었다. 조직에서 세포내 pH는 inorganic phosphate (Pi)와 phosphocreatine (PCr)정점 사이의 차이를 구하여 화학적 이동(Chemical Shift)으로 부터 구하였다. Pi, PCr, PME와 β-ATP의 평균 정점 면적을 구하여 각 치료군을 비교하였다.

4. 유세포 분석기(Flow Cytometry)

종양내의 세포 주기 분포를 관찰하기 위하여 488nm의 Argon Laser에서 FAC scan을 이용하였고 자료 분석은 Cell fit II라는 software program을 이용하였다.

5. 통계적 분석

본 실험에서 얻어진 결과의 유의성 검정은 회귀 직선 분석(Linear regression)을 최소자승법(least square method)으로 시행한 후 t-test로 검증하였다.

III. 결 과

종양의 성장 측정의 결과는 2-DDG를 투여한 군이 대조군에 비하여 성장속도가 느려짐을 알 수 있었다. 대조군의 5-12일된 종양의 종양 배가일은 0.84일이고 종양성장곡선 기울기는 0.828이었다. 13-28일된 종양의 종양 배가일은 3.2일이고 기울기는

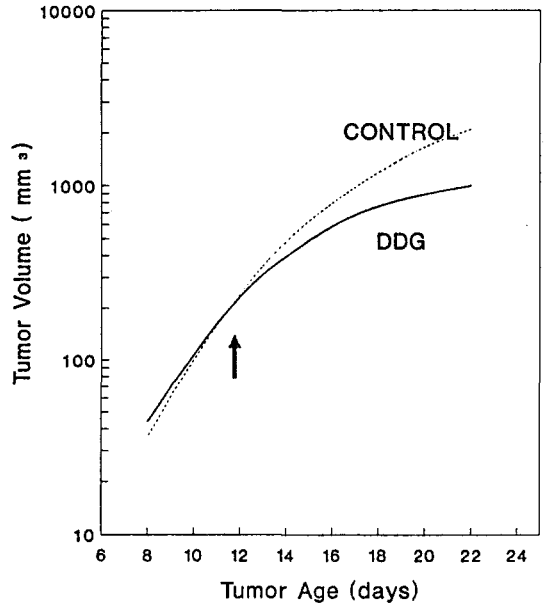


Fig. 1. Tumor Growth Curve, 2-DDG injected on 12th day of tumor implant (arrow indicates). Growth curve shows two portions of slope; initial slope, 0.828 with doubling time 0.84 days and slope at the 2nd portion of curve separated between DDG group and control group, 0.136 and 0.218 respectively. (P<0.05)

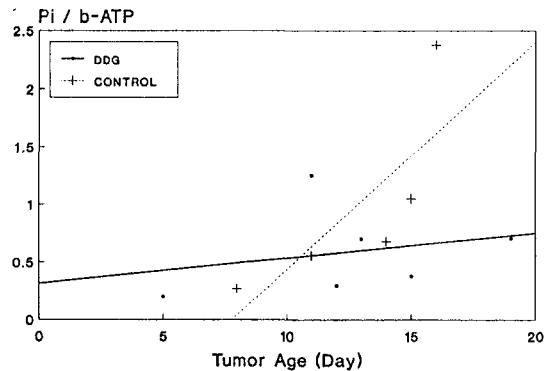


Fig. 2. Pi/βATP ratio increased with tumor growth and the rate of increase slowed down after 2-DDG injection. (0.1<P<0.15)

0.218이었다. 반면 2-DDG 투여군의 종양 배가일은 5.1일이고 기울기는 0.136으로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 1). 종양내의 세포내 pH는 6.9-7.2로 종양의 크기나, 2-DDG투여에 따라 별 차

이가 없었고 방사선 조사군 간에도 별 차이가 없었다. 자기공명 분광기 분석에 의하면 종양의 크기가 커짐에 따라 PME와 Pi가 증가하는데 2-DDG 투여로 증가율이 감소하는 경향을 관찰하였다.(Fig. 2, Fig. 3) 방사선 치료군에서는 PME의 증가율에 미치는 변화는 발견 할 수 없었고 단지 Pi의 증가율이 둔화 되는 경향을 볼 수 있었다.(Fig. 4) 유세포 분석 결과 2-DDG 투여 군에서 S phase와 G<sub>2</sub> + M phase가 증가되는 것을 관찰 하였으나 방사선 치료군에서는 세포주기에 미치는 영향을 관찰할 수 없었다. 방사선과 2-DDG를 병용함으로써 기대되었던 2-DDG에 의한 종양 성장 지연 효과는 본 실험에서는 관찰되지 않았다.(Fig. 5)

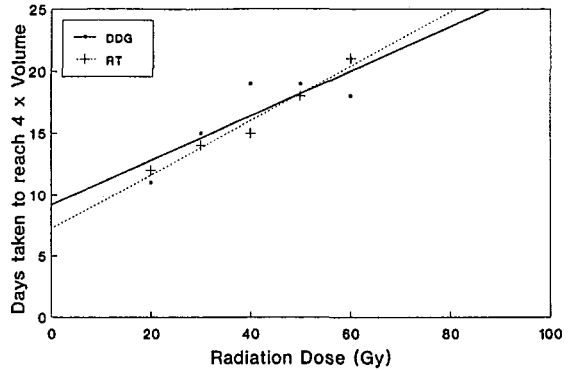


Fig. 5. No growth delay effect by RT + DDG compared with RT alone ; Tumor growth time in days after treatment to reach four times their initial treated volume.

### 고 찰

종양의 크기가 커질수록 종양내의 저산소 세포의 비율이 증가된다는 것이 알려져 있고 Urano등<sup>6</sup> 은 FSaII 에서 종양 체적이 250mm<sup>3</sup> 이상이 될때 저산소 세포의 비율이 급격히 증가된다고 보고하였다. 2-DDG가 당분해 경로를 차단함으로써 종양의 증식 능력을 억제하여 종양의 성장 속도를 느리게 한다는 보고가 있고 Jain, Kalia 등<sup>7</sup>에 의하면 Hela cell 배양액에 2-DDG를 높은 농도로 첨가함으로써 세포의 증식 속도가 현저하게 감소됨이 관찰되었다. 실제 본 실험에서도 대조군에 비하여 2-DDG투여군에서 종양의 배가 일수가 느려짐을 알 수 있었다. <sup>31</sup>P-자기공명 분광기로 관찰되는 인 대사물질들의 Spectrum을 분석함으로써 조직내의 대사과정, 특히 에너지 대사과정을 비침습적(non-invasive)으로 검사할 수 있다. <sup>31</sup>P-자기공명 분광기를 통해 관찰되는 인 대사물질로는 3가지 level의 adenosine triphosphate(ATP), Phosphocreatine(PCr), Phosphomonoseter(PME)와 inorganic phosphate(Pi)들로 나눌수 있다. 일반적으로 암조직에서의 PCr, ATP의 농도가 정상조직보다 낮으며 PME와 Pi의 농도가 증가하므로 암조직의 진단, 치료에 대한 반응을 관찰하는데 이용하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>8-12</sup> <sup>31</sup>P-자기공명 분광기와 유세포 분석기를

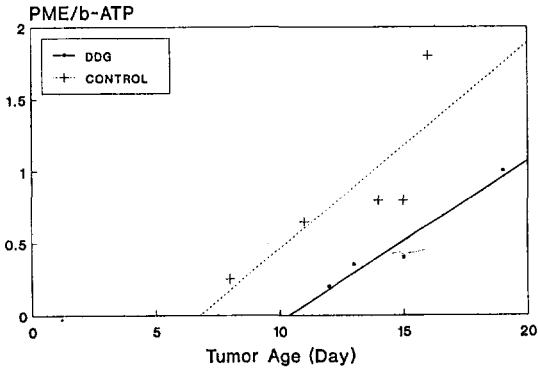


Fig. 3. PME/ $\beta$ ATP ratio increased with tumor growth and the rate of increase slowed down after 2-DDG injection. ( $P < 0.05$ )

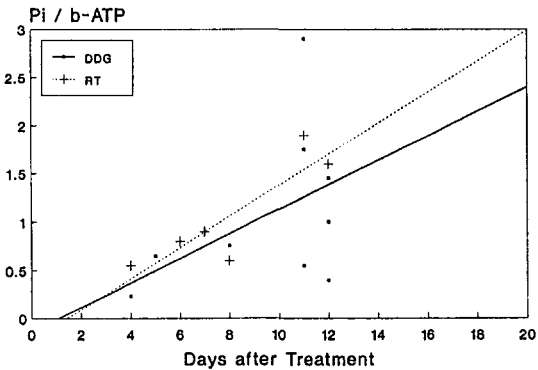


Fig. 4. 2-DDG slowed the rate of increase in Pi/ $\beta$ ATP ratio, plotted as a function of days after the treatment. ( $0.15 < P < 0.2$ )

통한 본 실험의 결과를 분석하면 섬유 육종에 대한 2-DDG의 영향은 1) 종양증식 속도의 억제, 2) 세포 괴사의 감소, 3) 세포가 방사선에 좀더 민감한 Cycle로의 진행, 등으로 2-DDG가 방사선 효과를 증가시킬 수 있을 것으로 기대되었다.<sup>8</sup> 그러나 2-DDG가 방사선치료와 병용함으로써 방사선의 효과를 증가시키는 방사선 민감제로 작용하리라는 가정은 본 실험에서는 입증되지 않았다. 이 원인으로는 2-DDG의 투여량의 문제나 혹은 2-DDG와 방사선치료와의 시간 간격상의 문제가 아닌가 생각된다. 본 실험에서는 2-DDG에 의한 방사선치료의 효과 증가는 입증되지 않았으나 <sup>31</sup>P-자기공명 분광기의 실험결과로 미루어 2-DDG가 적절한 양 투여된다면 2-DDG가 종양에 대한 방사선 민감제나 정상세포에 대해 방사선 보호제 역할을 할 수 있을 것으로 생각되며 2-DDG의 적절한 투여량과 투여 스케줄을 구하기 위한 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Jain VK, Pohilit W, Purohit SC: influence of energy metabolism on the repair of X-ray damage in living cells. Effects of 2-deoxy-d-glucose on the repair phenomena during fractionated irradiation of yeart. Rad Environm bioph 1975, 12 : 315-320.
2. Song, CW, Clement JJ, Levitt SH : Elimination of hypoxic protection by 5-thio-D-glucose in muticell spheroids. Cancer Res 1978, 38 : 4499-4503.
3. Purohit SC, Pohlit W : Experimental Evaluation of the glucose Antimetabolite, 2-Deoxy-D-Glucose as a possible Adjuvant to Radiotherapy of Tumors. Int J Rad Onc Biol Phy 1982, 8 : 495-499.
4. Gridley DS, Nutter RL, Mantik DW, Slater JM : Hyperthermia and Radiation in Vivo : Effect of 2-Deoxy-D-Glucose. Int J Rad Onc Biol Phy 1985, 11 : 567-574.
5. Jain VK, Porscheu W, Feinendegen LE : Optimization of cancer therapy : Part II -Effects of combining 2-Dexoy-D-Glucose treatment with gam-

- mairradiation on Sarcoma-180. Indian J Exp Biol 1977, 15 : 714-718.
6. Urano M, Kahn J, Kenton LA : Thermochemotherapy (combined cyclophosphamide and hyperthermia) with or without hyperglycemia as an adjuvant to radiotherapy. Int J Rad Oncol Biol Phys 12(1) : 1986, 45-50.
7. Jain KV, Kalia VK, Sharma R, Maharajan V, Menon M : Effect of 2-Deoxy-D-Glucose on Glycolysis, proliferation kinetics and Radiation Response of Human Cancer Cells. Int J Rad Biol Phys 1985, 11 : 943-950.
8. 장혜숙, 최은경, 조정길, 임태환, 이대근, 이윤, 조영주, 김근섭 : 2-DDG가 FSaII 종양의 성장속도와 증식능력, 신진대사에 미치는 영향 : <sup>31</sup>P-자기공명분광기와 유세포 분석기를 이용한 연구. 치료방사선과 학회지 1991, 9 : 1-6.
9. Ng TC, Evanochko WT, Hiramoto RN : <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy of in Vivo tumors. J Magn Resonance 1982, 49-271-286.
10. Schiffer LM, Braunschweiger PG, Glickson JD : Preliminary observations on the correlation of proliferative phenomena with in Vivo <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy after tumor chemotherapy. Ann Ny Acad Sci 1986, 461 : 270-277.
11. Ng TC, Vijayakumar S, Major AW, Meaney TF : Application of in Situ Megnetic Resonance Spectroscopy to Clinical Oncology. Cancer Bull 1988, 40 : 126-134.
12. Koutcher JA, Damadian R : Spectral differences in the <sup>31</sup>P-NMR of normal and malignant tissue. Physiol Chem Phys 1977, 181-187.

감사의 말씀

본 실험을 위하여 암세포를 기증하여 주신 서울의대 하성환교수께 감사드리고 본 실험이 성공적으로 수행되도록 도와주신 아산생명과학 연구소 연구원들 특히 NMR 연구실의 이대근 선생님, 세포생물학연구실의 조영주 선생님, 동물실의 김근섭 선생님께 깊은 감사올 드립니다. 방사선 생물학 연구실의 서점순 위촉연구원의 헌신적인 노고에 감사드리고 치료방사선과 전공의와 전임의의 노고에 감사드립니다.