

구강편평세포암종 이식 누드마우스에서의 혈액 점도 변화

명훈, 이종호, 정필훈, 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학 교실

‘이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구
되었음 (KRF-2002-041-E00224).

교신저자

명 훈

서울시 종로구 연건동 28번지

서울대학교 치과대학

구강악안면외과학교실

tel:02-760-3059

fax:02-766-4948

E-mail:myoungh@snu.ac.kr

Abstract

It is well known that malignant tumor have hypoxic cell fraction, which is radio resistant and is one of the most important cause of local recurrence after radiotherapy. One of the causes of hypoxia in tumor is blood flow decrease due to increase in blood flow resistance and one of the causes of increased blood flow resistance could be attributed to the increase in blood viscosity. For the evaluation of the change of blood viscosity in oral cancer, experiments were carried out to test the change of blood viscosity among the normal control and xenografted oral cancer nude mice.

Relative viscosity measured against distilled water was 3.30 ± 0.14 for normal control, and 3.67 ± 0.62 for tumor bearing mice at the first time of blood sampling in experimental period ($100 \text{ mm}^3 < \text{tumor volume} < 200 \text{ mm}^3$). There was no statistically significant difference between the control group and experimental group ($p > 0.05$). However, as the tumor grew, significant difference of blood viscosity was detected at the third time of blood sampling (control group: 3.37 ± 0.59 , and experimental group: 4.31 ± 0.41 $300 \text{ mm}^3 < \text{tumor volume}$, $p < 0.05$).

Increase in blood viscosity was confirmed with this experimental study and it can be postulated that modification blood viscosity might contribute to decrease of hypoxia fraction in oral cancer, thus improve the effect of radiotherapy.

key words: oral cancer, blood viscosity

서론

악성 종양환자는 종양세포에서 발현되는 각종 cytokine 등에 의해 비정상적 생리적 변화가 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 변화로 인해 체중의 감소, 식욕의 감소, 대사의 변화 등이 발생한다. 생리적 변화의 감시를 통한 암종의 조기 발견 및 치료에 대한 감수성 증대는 치료 후 예후 증진을 위해 큰 도움이 될 것으로 기대되므로 이러한 기전과 원인을 연구함으로써 악성 종양의 진단과 치료에 응용하고자 하는 노력이 필요하다. 이러한 노력의 일환으로 정상세포와는 다른 악성 종양 세포변화 중 종양 내 저산소 세포에 기인한 생리적 변화에 대한 연구가 이루어져 왔다. 많은 연구를 통해 고형 종양 (solid tumor) 내에는 많게는 20% 이상의 저산소 상태의 세포가 존재함이 밝혀졌는데¹⁻³⁾, 이러한 저산소 세포는 수술 전, 후 방사선 치료 시, 방사선 항암 효과의 주 인자인 자유기 (free radical)에 대한 저항성이 있어 방사선에 의한 세포사 효과를 감소시키는 원인으로 작용한다^{4,5)}. 저산소 세포는 종양 내 신생혈관 발달이 저하되어 종양세포로 혈액 공급의 부족하게 되고 종양 내 비균질적 혈관분포에 기인한 혈류부족, 혈류저항의 증가로 인한 혈류감소 등으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있고 이 중 혈류저항의 증가는 종양혈관의 사행성 (tortuosity), 혈액의 점도성 (viscosity) 증가 등이 원인으로 작용한다고 추측되고 있다⁶⁾. 이 중 종양 발생 시 인체 내 혈액의 비정상적인 점도 증가는 일부 고형성 종양에서 보고되어, 종양의 진단과 술 후 예후 측정 지표로서 제시되었으나^{7,8)} 구강 내 발생한 악성 종양에 대한 혈액 점도의 변화는 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 구강에 발생하는 악성 종양 중 가장 많은 빈도로 발생하는 구강편평세포암종 발생 시 혈액 점도의 변화를 알아보고자 예비연구단계로서 구강편평세포암종 세포주 (KB, ATCC)를 이종이식한 누드 마우스에서의 혈액 점도를 정상 누드 마우스와 비교하여, 구강편평세포암종 발생 시 비정상적 혈액 점도의 변화가 혈액동력학적 예후 및 진단 표지자로서 응용될 수 있는지 가능성을 알아보고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 누드마우스 및 구강편평상피세포암종 세포접종체(cell inoculum) 준비

누드마우스는 BALB/c/nu(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Korea)를 기본종으로, 20 마리 모두 생후 6-8 주, 체중이 약 20 g의 암컷만을 사용하였다. 멸균 소독된 쥐장에서 멸균된 물과 사료를 공급하였고, 층판기류 (lamina flow)를 지속적으로 유지한 크린 벤취 속에 두어 청정한 환경을 유지하였으며, 모든 술식 또한 크린 벤취 속에서 시행하였다. 누드마우스의 주야간 생물학적 주기를 위하여 실내등을 12 시간은 조영하고, 12 시간은 점멸하였다.

KB 세포주(ATCC, VA, USA)를 기본세포주로 하여, 10% fetal bovine serum(Gibco, NY, USA), 100 U/ml 페니실린과 100 g/ml 스트렙토마이신(Gibco, NY, USA) 항생제를 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(Gibco, NY, USA) 10 ml를 2 일에 한 번씩 교환하면서 지름 80 mm의 세포 배양용 플라스크(Nunc, Denmark)에서 37°C, 습도 90%, 5%의 CO₂ 및 95%의 공기의 조건을 유지하는 세포배양기에서 배양 및 계대 배양하여 증식하였다. 증식된 세포는 계대 배양 시와 같이 Trypsin (0.1%)-EDTA 3 ml를 넣고 배양기에서 5 분간 세포를 부양시켰다. 부유액을 원심분리(1200 rpm, 3 분)하여 세포를 농축하고 hemocytometer로 세포수를 산정하여 세포접종체를 준비하였다.

2. 종양유도 및 종양크기 측정

준비된 세포접종체를 이용하여, 누드마우스 한 마리당 0.2 cc의 배양액에 포함된 약 5×10^6 개의 세포를 1 cc 주사기 및 25 게이지의 주사바늘을 이용하여 누드마우스 등 (flank)에 피하주사 접종하였다. 종양의 길이와 너비를 caliper로 3 일에 한 번씩 측정하여 Gutman 등이 제안한 방법의 공식으로 종양의 부피를 산출하였다. 이식 전 각 개체의 혈액을 채취하여 기저점 (base-line)에서의 혈액점도에 이용하였고, 이식 후 종양의 용적이 100내지 150mm³에 도달한 군 (exp group)과 대조군 (control group)으로 나누어 혈액을 재채취 하였으며, 종양의 부피가 증가함에 따른 시기별 각 개체 내 혈액 점도의 변화를 측정하기 위해 실험군의 각 개체의 1차 혈액 채취 후 종양의 부피가 2배 되는 시기와 3배가 되는 시기에 각각 혈액을 채취하였다. 대조군으로는 암종세포주 없이 동량의 배양액을 같은 방식으로 피하 주사한 정상 누드마우스의 혈액을 채취하여 사용하였다.

3. 혈액채취

5g의 EDTA를 증류수 20ml에 녹여 만든 EDTA 용액 20 μ l를 tube에 담아 혈액 채취용 튜브로 사용하였다. 1ml 주사기로 심장천자를 시행하여 0,75ml 채취하였으며 EDTA 튜브에 옮겨 담은 후 충분히 흔들어 혈액의 응고를 방지하였다. 혈액 채취 후 1시간 이내에 혈액 점도 측정을 하였으며 혈액의 온도를 유지 하기 위하여 37°C 부란기에서 15분 방치 후 사용하였다

4. 혈액점도 측정

25G 척수 천자침 (외경 0.5mm, 내경 0.3mm, 길이 89mm)와 연결된 1ml 주사기에 채취한 혈액 중 0.7 ml의 전혈을 채우고, 수온 37.5°C로 유지되고 있는 1000 ml 유리병 안에 위치시킨 후, 측정점에서 60cm 상방에서 수압을 가하여 0.5ml의 혈액이 주사침을 통과하는데 소요되는 시간을 측정하였다. (Fig. 1). 매 측정 시마다 증류수로 보정을 시행하였으며 혈액의 상대점도는 다음의 식을 이용하여 구하였다.

상대점도 = 0.5ml의 전혈이 통과하는 시간 (sec) / 0.5ml의 증류수가 통과하는 시간 (sec)

5. 통계분석

실험군과 대조군의 상대점도의 차이에 대한 통계적 분석은 t-test를 이용하였고 유의수준은 95%로 설정하였다.

연구결과

1. 종양발생 시 군별 혈액점도의 변화 (Fig.2)

종양을 이식하지 않아 종괴가 형성되지 않은 대조군 (n=7)의 혈액점도는 기저점 및 실험군의 종양 발생 후 같이 시행한 1차 채혈 시점에서 3.25 ± 0.22 , 3.30 ± 0.14 였다. 실험군 (n=12)의 기저점에서의 혈액점도는 3.28 ± 0.42 로서 투여 직후 종괴가 형성되기 전의 혈액점도는 실험군과 차이가 없었다. 종괴가 형성되어 종양의 용적이 100 mm^3 이상 도달한 실험군의 혈액점도는 3.67 ± 0.62 로 나타나 같은 시기에 측정된 대조군의 혈액점도에 비해 수치적으로는 약 10%의 점도증가를 보였으나 Mann-Whitney-U검정상 통계적 유의성은 검출되지 않았다.($p > 0.05$)

2. 종양의 크기 변화에 따른 시기 별 혈액점도의 변화 (Fig. 3)

종양의 용적이 100내지 150 mm^3 에 도달한 실험군의 종괴의 부피가 각각 2배 (n=9) 및 3배 (n=4)에 도달한 시기에 측정된 혈액점도는 각각 4.01 ± 0.38 , 4.31 ± 0.41 이었으며 같은 시기에 측정된 대조군 (n=7)의 혈액점도는 3.54 ± 0.62 및 3.37 ± 0.59 로 나타나 종괴의 부피가 2배인 경우, 대조군에 비해 약 12%의 점도 증가를 보였고 1차 채취 시기에 비해서 2%의 수치적 점도 증가가 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다. 종괴의 부피가 3배에 이른 시기에 측정된 실험군의 혈액점도는 같은 시기에 측정된 대조군에 비해 22%의 점도증가를 보였고 통계적 유의성이

있었다. ($p < 0.05$)

고찰

구강암은 인종, 지역별로 차이는 있으나 1년에 인구 10만 명 당 약 2-6명씩 새로이 발생한다고 알려져 있으며 악성종양의 약 3-5%정도를 차지하는 것으로 알려져 있다^{9,10}. 이러한 수치로 보아 구강암은 매우 중요하게 다루어야 할 악성암의 하나이며, 발생하게 되면 발생부위의 해부학적 복잡성과 림프절 전이로 인해 불량한 예후를 보이므로 병소의 조기 발견과 예후 예측에 의한 명확한 치료 프로토콜의 수립이 생존률 증진에 필수적이라고 할 수 있다. 전술한 바와 같이 몇 가지 고형성 악성 종양 내에 저 산소상태의 악성종양 세포군이 존재한다는 사실은 이미 여러 문헌을 통해 검증된 바 있으며 저산소 세포는 치료방사선에 대한 감수성이 적어 방사선 치료의 효율을 떨어뜨리는 요인으로 보고 있다¹⁻³. 방사선 비감수성 저산소 세포를 줄이기 위해 고압산소요법에 의한 혈장내 산소분압 상승, 말초 혈관의 확장을 통한 혈류의 증대, 고 에너지 방사선의 사용, 인공 혈액에 의한 산소의 확산도 증가 및 해리도 증가 등이 제시되었고, 연구되었다^{1,11}. 실지로 후두암 환자에 대한 고압산소치료 후 방사선 치료 시 치유 및 생존율 증가가 있었다고 보고된 바도 있었으나¹¹. 아직은 임상적으로 유의하게 사용되는 방법은 없는 상태이다. 본 연구에서는 암종으로 인한 환자의 전신적 생리학적 변화 중 악성암종 환자의 혈액 점도의 증가경향이 있음에 착안하여 구강암 세포주를 접종한 동물모델을 이용하여 혈액점도가 변화가 있는지를 알아보려고 하였다.

군별 혈액점도의 변화에서 대조군의 혈액점도는 기저점 및 실험군의 종양 발생 후 같이 시행한 1차 채혈 시기에서 거의 차이가 없게 나타나 혈액 점도의 항상성이 이루어짐을 알 수 있었다. 실험군의 투여 직후 종괴가 형성되기 전의 혈액점도는 대조군과 차이가 없었다. 종괴의 용적이 100 mm^3 이상 도달한 실험군의 혈액점도는 대조군의 혈액점도에 비해 수치적으로는 약간 높아진 것으로 나왔으나 통계적으로는 유의하지 않아 구강암 형성 초기에는 종양으로 인한 혈액의 점도에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러나 이후 실험군의 종괴의 부피가 각각 2배 및 3배에 도달한 시기에 측정된 혈액점도는 대조군과 1차 채혈 시에 비해 혈액점도가 증가한 것으로 나타났고 특히, 종괴의 부피가 3배에 이른 시기에 측정된 실험군의 혈액점도는 같은 시기에 측정된 대조군에 비해 평균적으로 22% 이상의 유의한 점도 증가를 보여 구강암의 종양부피가 커지면서 혈액점도가 증가한다는 것을 알 수 있었고 비록 동물실험 결과이기는 하나 실제 종양의 진행에 따라 구강암 환자의 혈액점도가 증가한다는 것을 시사하였다.

연구에 의하면 산소공급이 충분한 세포군과 저산소 세포군의 방사선 조사 후 생존률을 보면 저산소 세포군이 훨씬 낮은 방사선 감수성을 보이는데 이는 방사선에 의해 생성된 자유기 (free radical)에 의한 DNA의 손상이 산소에 의하여 고정 (fixation) 되지 못하고 회복되기 때문인 것으로 알려져 있다¹²⁾. 현재 다른 고형성 종양과 마찬가지로 수술과 방사선 치료가 주된 치료방법인 구강암에 있어서 본 연구 결과에서

시사하는 바와 같이 혈액점도 증가에 의한 저산소 세포군이 존재할 가능성이 있어 구강암의 방사선 치료 시 고려할 요소로 판단된다. 또한 혈관내 혈류량은 동정맥간 혈압의 차이와 혈관의 수, 길이, 내경, 및 분지 형태등에 의한 기하학적 저항 (geometrical resistance) 및 혈액의 점도성 저항 (viscous resistance)에 의해 결정되며 혈액의 점도성 저항은 본 연구에서 보고자 한 혈액의 점도에 의해 결정되는데 혈액의 점도는 혈장의 점도, 적혈구 용적률, 적혈구 응집, 적혈구 변형성, 혈장단백의 농도에 의해 영향을 받게 되므로 향후 이러한 요소에 대한 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

연구결과 중 종양의 크기가 커질수록 혈액의 점도가 커진 것은 종양세포의 증가에 따른 각종 종양세포분비 cytokine의 증가로 인해 나타나는 현상으로 보여지는데 발생 초기, 별다른 자각증상이 없어 종양의 크기가 상당히 증가한 상태에서 발견이 되는 구강암의 특성 상 혈액점도의 증가로 인한 방사선 치료 효과의 감소는 중요한 임상적 의미를 가질 것으로 보이며 혈액동력학적 개선에 관한 여러 가지 치료적 시도를 통해 구강암의 수술 전, 후 방사선 치료효과를 높이는 노력이 필요함을 시사하였다.

본 연구에서 수행한 혈액의 점도 측정은 비교적 손쉽게 측정이 가능하나 뇌출혈, 뇌경색, 고혈압, 협심증, 당뇨병, 혈관성 노인성 치매 등 환자의 전신적인 상태에 따른 변이가 심하다는 단점이 있어 저산소 세포군의 보다 명확한 측정을 위해서는

적혈구 변형성 (deformability)과 같이 보다 안정적인 요소에 대한 연구도 진행이 되어야 할 것으로 보인다. 비정상적인 적혈구 변형성(deformability)은 종양 산소화 (oxygenation)의 감소와 종양조직으로의 항암제의 전달의 감소를 초래한다는 보고가 있어 방사선 감수성과 더불어 항암치료법에 대한 예후지표로도 사용될 가능성이 있으며 보다 용이하게 혈액동력학적 평가를 할 수 있는 기기에 대한 개발도 기대된다.

참고문헌

1. Guichard M Chemical manipulations of tissue oxygenation for therapeutic benefit. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1989
2. Moulder JE, Rockwell S. Hypoxic fractions of solid tumors: experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. Int J Radiat Oncol Biol Phys.10(5):695-712,1984
3. Denekamp J, Fowler JF, Dische S. The proportion of hypoxic cells in a human tumor. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2(11-12):1227-8, 1977
4. Powers WE, Tolmach LJ. A multicomponent x-ray survival curve for mouse lymphosarcoma cells irradiated in vivo. Nature. 16;197:710-1, 1963
5. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br J Cancer. 9(4):539-49, 1955
7. Miller B, Heilmann L. during treatment. Cancer. 15;62(2):350-4. Hemorheologic variables in breast cancer patients at the time of diagnosis,1988
6. Jain RK. Determinants of tumor blood flow: a review.Cancer Res. 15;48(10):2641-58. 1988
8. Miller B, Heilmann L. Hemorheological parameters in patients with gynecologic malignancies. Gynecol Oncol33(2):177-81, 1989
9. Boring CC, Wquires TS, Tong T. Cancer statistics. Cancer J. Clin 42:19-38, 1992

10. Wong DTW, Todd R, Tsuiji T, Donoff RB. Molecular biology of oral cancer. Crit. Rev. Oral Biol. 7:319-328, 1996
11. Henk JM. Late results of a trial of hyperbaric oxygen and radiotherapy in head and neck cancer: a rationale for hypoxic cell sensitizers? Int J Radiat Oncol Biol Phys. 12(8):1339-41, 1986
12. Hall EJ. The oxygen effect and reoxygenation. In Radiology for the radiologist. (4th Ed) J. B. Lippincott, Philadelphia, 1994:pp133~152

Fig. 1 Schematic presentation of blood viscosity measurement

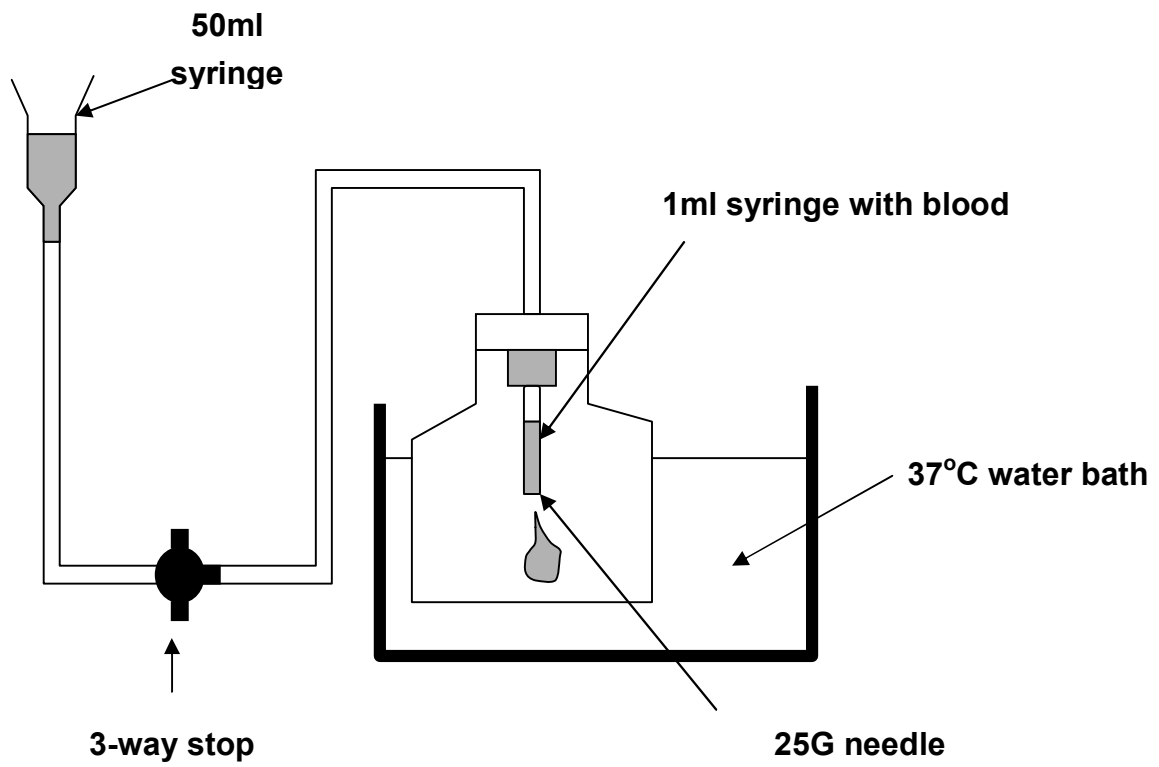


Fig. 2 Blood viscosity in tumor model (baseline and at the timing of tumorigenesis)

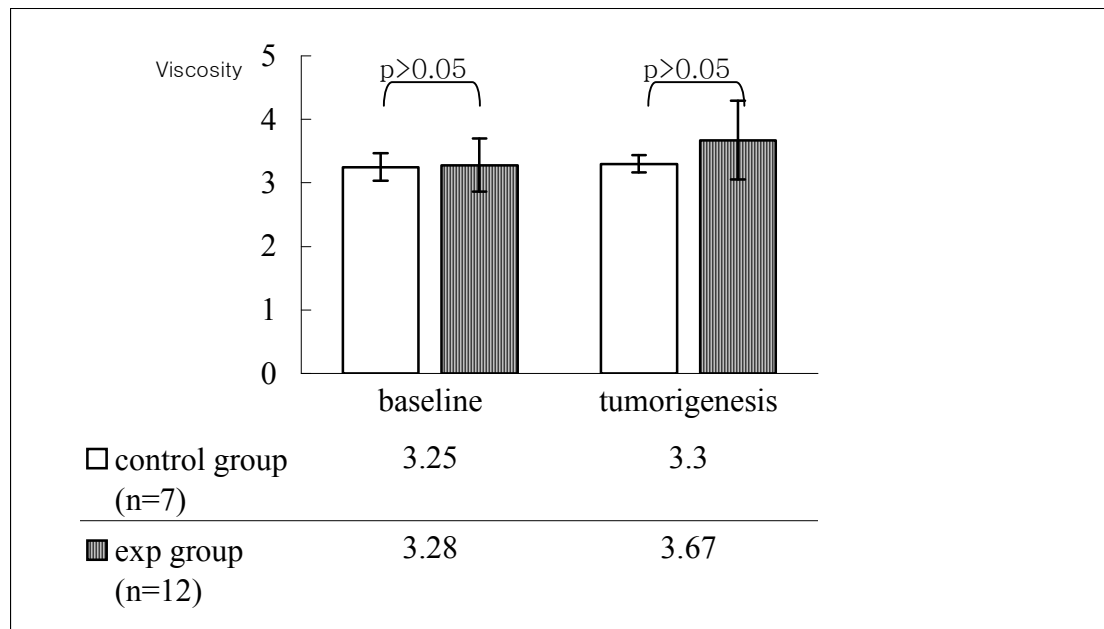


Fig. 3 Blood viscosity through tumor growth

(control group.1 and 2: control group at the timing of exp. group 1 and 2, respectively, exp

group : experimental group, **: statistically significant)

