

# 마우스공장 소낭선세포의 방사선 감수성에 관한 실험적 연구

순천향대학 의학부 방사선과학교실

허 승 재

서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실

박 찬 일

= Abstract =

## Radiosensitivity and Dose-Survival Characteristics of Crypt Cells of Mouse Jejunum

Seung Jae Huh, M.D., Charn Il Park, M.D.\*

*Department of Radiology, College of Medicine, Soonchunhyang University*

*Department of Therapeutic Radiology, College of Medicine, Seoul National University\**

To determine the radiosensitivity and dose-survival characteristics of jejunal crypt cells, experimental study was done using total 40 mice. Single irradiation of 1,000 rad to 1,600 rad was delivered to whole bodies of mice, using a cesium 137 animal irradiator. The number of regenerating crypts per jejunal circumference was counted, by using a jejunal crypt cell assay technique, and dose response curve was measured. The average number of jejunal crypt per circumference in control group was  $140 \pm 10$ . Mean lethal dose ( $D_{50}$ ) of mouse jejunal crypt cell was 135 rad.

### 서 론

방사선조사에 의한 cell killing effect를 측정하여 조사선량에 따른 세포생존곡선을 작성하는 것은 방사선생물학 연구의 가장 기본적인 단계이다. 세포생존곡선은 1956년 Puck<sup>1)</sup>에 의해 체외실험을 통하여 시도된 이후, 비장집락측정법<sup>2)</sup>(spleen colony assay), 마우스 피부상피측정법<sup>3)</sup>, 마우스공장 소낭선측정법<sup>4)</sup>(jejunal crypt cell assay) 등이 생체내 실험방법으로 보고 되었다. 마우스공장소낭선 측정법은 1970년 Withers와 Elkind<sup>4)</sup>에 의해 고안된 후, 전신방사선조사로서 간편하게 분할조사방법 조사선량을 및 방사선 종류에 따른 생물학적 효과비(relative biologic effectiveness) 및 항암제 등의 병용요법시 방사선 조사효과에 미치는 영향등을 연구하는데 이용되어 왔다<sup>5~7, 13)</sup>. 저자는 향후 지속적인 방사선 생물학적 연구를 위하

여 마우스공장소낭선 세포의 방사선 감수성과 세포생존곡선의 특성을 연구하여 보고하는 바이다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 재 료

생후 8~12주 된 체중 18~22 gm의 C<sub>3</sub>H 순종마우스 암컷 40마리를 사용하였으며 모두 배합사료로 사육하였다. 40마리를 대조군 5마리, 방사선 조사군 35마리로 구분하였고, 방사선조사군은 1,000 rad에서 100 rad씩 증가시켜 1,600 rad까지 5마리씩 7소군으로 구분하여 단일 조사하였다(Table 1).

#### 2. 방 법

방사선조사는 동물실험용 세시움 방사선조사기(미, J.L. Shephend & Asso. 제품)를 사용하였으며, 선원의 방사능은 7,800 Ci였고, 열형광선량계로 측정된 선량

Table 1. Experimental Design

Group	Radiation Dose(rad)	No. of Mouse
Control	—	5
Radiation	1,000	5
	1,100	5
	1,200	5
	1,300	5
	1,400	5
	1,500	5
	1,600	5

Table 2. Regenerating Crypts per Circumference in Radiation Alone Group

Radiation(rad)	Crypts per Circumference
1,000	105±11(S.D)
1,100	87±9
1,200	45±8
1,300	30±4
1,400	28±8
1,500	6±3
1,600	2±1

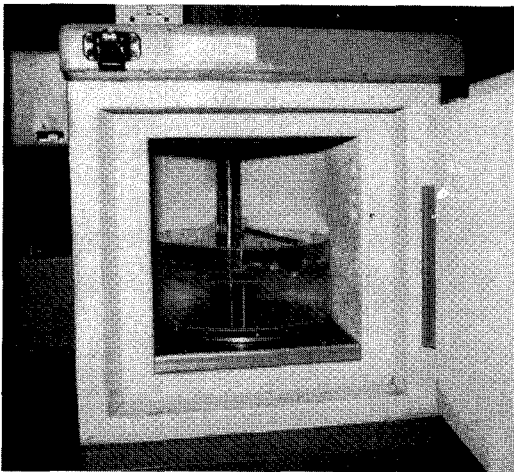


Fig. 1. Irradiation setup with Cesium-137 animal irradiator.

율은 분당 920 rad 였다. 방사선조사는 마우스를 세시움조사기내의 회전 루싸이트 통내에 넣고, 행동이 제한되지 않은 상태에서 시행하였고, 방사선조사시 루싸이트통이 선원을 중심으로 회전하여 마우스 전신에 균일하게 조사되었다(Fig. 1).

대조군은 방사선조사없이, 방사선조사군은 조사 후 90시간 후에 경부탈구로 도살개복하여 유문부에서 6 cm 이하 부위에서 2 cm 길이의 공장을 절단 적출한 후, 24 시간 포르마린에 고정후 공장의 횡단면상을 관찰하기 위하여 1 cm 간격으로 횡절단하여 마우스당 2개의 조직 절편을 제작, H-E 염색하여 조직표본을 제작하였다. 소낭선세포측정은 Withers와 Elkind의 방법에 의하였다<sup>4)</sup>. 즉 방사선 조사 후 소낭선 재생의 판별기준은 소낭선이 최소 10개이상의 세포로 구성되고, 각 세포의 세포질은 거의 없고, 뚜렷한 핵으로 구성된 세포가 밀집된 경우를 기준으로 하였다. 관찰된 재생된

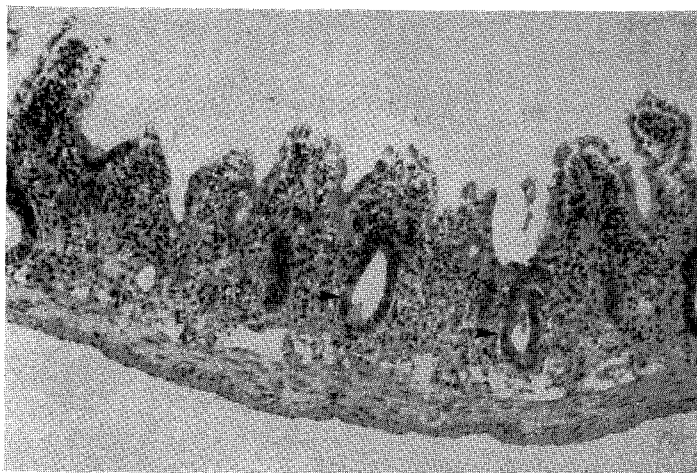


Fig. 2. Transverse section of mouse jejunum, 90 hours after 1,400 rad irradiation. Several crypts show regeneration.

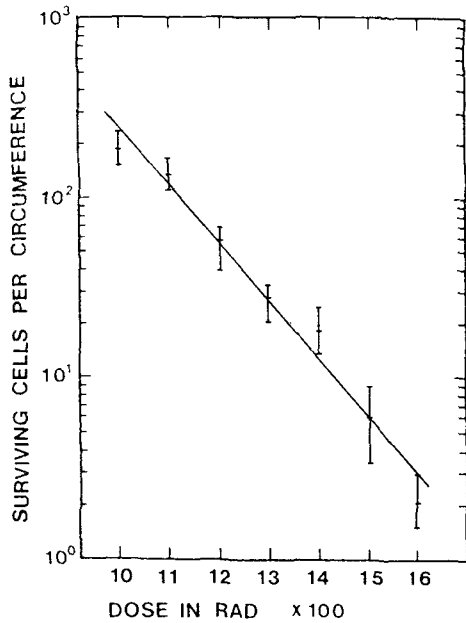


Fig. 3. Dose-survival curve for jejunal crypt cells, exposed to single dose of  $\gamma$ -ray.

소낭선수를  $x$  로, 대조군에서 관측된 소낭선의 평균치는 140이었으므로, 파괴된 소낭선의 비율은  $(F) 140-x/140$  이 되므로, 소낭선당 생존하는 세포의 비율은  $-\log^F$  가 되어, 환상면(circumference)당 생존하는 소낭선세포 수는  $-140\log^F$  또는  $-140\log^{140-x/140}$  으로 계산하여 반대수눈금지(semi-logarithmic paper)에  $x$  축에 방사선조사량,  $y$  축에 환상면당 생존소낭선 세포수를 표시한 후 선형회귀분석을 통하여 세포생존곡선을 작성하여, 이곡선에 의거하여 소낭선세포의 평균치사선량(mean lethal dose,  $D_0$ )을 구하였다.

### 실험 결과

방사선조사를 시행한 1,000 rad 에서 1,600 rad 까지의 각소군별 소낭선의 관측치는 Table 2와 같이 조사선량의 증가에 따라 현저한 감소를 보였다(Fig. 2). 재생된 소낭선의 관측치( $x$ )와 대조군의 소낭선 관측치 140을 이용하여  $140(-\log^{140-x/140})$ 의 식을 이용하여 환상면당 생존 소낭선 세포수를 선량별로 최소자승법에 의하여 세포생존곡선(Fig. 3)을 구하였으며 이때 평균치사선량은 135 rad 였다.

세포생존곡선 실험은 1956년 Puck<sup>11)</sup>에 의해 체외에서 HeLa 세포를 이용하여 시도되었으나, 임상에 이용되지 못하였고 임상적용을 위한 생체내 실험이 여러가지로 시도되었다. 이들 중 비장집락측정법<sup>2)</sup>, 마우스 공장 소낭선 측정법<sup>4)</sup> 등에 의한 실험이 최근 방사선 생물학적 연구의 기본이 된 실험적 연구였다.

소장소낭선세포는 소장 응모 상피의 내막을 형성하는 stem 세포로서 분열속도가 매우 빠르고 방사선 조사 후 소낭선의 재군집화(repopulation)는 세포주기가 12시간이내로 매우 활발해서 1,000 rad 이상 방사선 조사시 3~4일 후에는 재생 소낭선(regenerating crypt)을 관찰할 수 있으며 이러한 특징을 이용하여<sup>8)</sup> 1969년 Withers 는 방사선 조사후 13일 후에 방사선조사된 공장점막의 결절을 육안적으로 관찰하여 세포 생존곡선을 작성하는 macrocolony technique 을 고안한 후<sup>9)</sup>, 1970년 전신조사후 마우스공장소낭선 재생을 관찰하는 소낭선세포측정법을 고안하였다<sup>4)</sup>.

이후 여러 저자들에 의하여 소낭선세포측정법을 이용하여 분할조사시 준치손상(sublethal damage)의 회복선량(repair dose)을 측정하였으며<sup>13)</sup> 마우스공장소낭선세포의 방사선조사후 준치손상의 회복력은 강하여 회복선량은 380~450 rad 로 보고 되었고<sup>9,13)</sup>, 중성자선을 이용한 실험에서 준치사 손상의 회복선량은 200 rad 로 보고되었다<sup>5,10)</sup>. 또한 각종항암제와의 병용치로서 dose effect factors 의 정량적 분석에도 소낭선 세포측정법이 이용되어 항암제와 방사선조사시 조사효과상승의 기전을 규명하는데 연구가 되었다<sup>11)</sup>.

세포생존곡선에서 평균치사선량은  $D_0$  또는  $D_{37}$ 로 표시되는데 세포생존곡선의 기울기와 일치하며, 일정세포군의 37%의 세포를 생존시키는 선량을 의미하며 방사선 감수성의 지표가 된다. 보고<sup>8,12)</sup>에 의하면 정상 산소공급 상태에서 HeLa 세포의 평균치사선량은 150 rad, 마우스백혈병세포의 경우 100 rad, 마우스 소장세포는 130 rad 로 보고되고 있으며, 마우스 공장소낭선 세포의 평균치사선량은 100~140 rad 로 보고되고 있으며, 저자의 실험결과인 135 rad 와 일치한다.

세포의 산소화에 따른 평균치사선량의 차이는 현저해서 저산소 세포군의 평균치사선량은 정상산소분압을 갖는 세포의 평균치사선량에 비해 2.5~3배의 차이를 보여서 방사선감수성의 감소를 보고하고 있으며<sup>12)</sup>, 저산소세포군의 방사선 감수성을 높이기 위한 시도는 약

성종양치료시 치유율을 상승시킬 수 있는 중요한 인자이며 최근 방사선종양학의 관심의 초점이 되고 있다.

본 연구의 방법 및 결과를 토대로 향후 각종 장기의 준치사손상의 회복 및 항암제와의 병용치료시 효과증강을, 중성자선등 고에너지 전파 방사선의 선량반응곡선을 이용한 생물학적 효과비의 지속적인 연구가 필요하다고 하겠다.

## 결 론

마우스 공장 of 방사선조사시 방사선에 의한 선량반응곡선과 방사선감수성을 연구하기 위하여 C<sub>3</sub>H 마우스 40마리를 대상으로 세시움방사선 조사기를 사용하여 1,000 rad 부터 100 rad 간격으로 1,600 rad 까지 단일조사하였다.

방사선조사 후 90시간이 경과후 마우스공장을 횡절 단한 조직표본을 제작, 공장소낭선 세포측정법을 이용하여 환상면당 재생하는 소낭선의 수를 측정하여 소낭선 세포의 선량반응곡선을 작성하였으며, 결과는 다음과 같다.

1. 대조군의 환상면당 공장소낭선의 수는 평균 140 ± 10이었다.
2. 방사선조사를 시행한 실험군의 마우스 공장소낭선 세포의 평균치사선량(D<sub>0</sub>)은 135 rad 였다.

## REFERENCES

- 1) Puck TT, Marcus PI: *Action of x-rays on mammalian cells. J Exptl Med* 103:653~666, 1956.
2. Berry RJ, Andrews JR: *Quantitative relationships between dose and reproductive capacity of tumor cells in a mammalian system in vivo. Radiology* 77:824~830, 1961.
3. Withers HR: *The dose-survival relationship for irradiation of epithelial cells of mouse skin.*

*Br J Radiol* 40:187~194, 1967.

4. Withers HR, Elkind MM: *Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. Int J Radiat Biol* 17:261~267, 1970.
5. Withers HR, Mason K, Reid BO, et al: *Response of mouse intestine to neutrons and gamma rays in relation to dose fractionation and division cycle. Cancer* 34:39~47, 1974.
6. Withers HR, Thames HD, Peters LJ: *Biological bases for high RBE values for late effects of neutron irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8:2071~2076, 1982.
7. Phillips TL, Fu KK: *The interaction of drug and radiation effects on normal tissues. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 4:59~64, 1978.
8. Duncan W, Nias AHW: *Early response of normal tissue. In Clinical radiobiology Edinburgh, Churchill Livingstone* 1977, 82:90.
9. Withers HR, Elkind MM: *Radiosensitivity and fractionation response of crypt cells of mouse jejunum. Radia Res* 38:598~613, 1969.
10. Withers HR, Brennan JT, Elkind MM: *The response of stem cells of intestinal mucosa to irradiation with 14 MeV neutrons. Br J Radiol* 43:796~801, 1980.
11. von der Maase H: *Interaction of radiation and 5-FU, cyclophosphamide or methotreate in intestinal crypt cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 10:77~86, 1984.
12. Hall EJ: *Cell survival curves. In Radiobiology for the radiologist, 2nd ed. Hagerstown, Harper & Row, Publishers* 31~50, 1978.
13. 고병희, 함창곡, 김정진 : 단일조사와 분할조사시 마우스 공장 소낭선세포의 방사선 효과에 관한 실험적 연구. *한양의대학술지* 5:217~226, 1985.