

랫드에서 cyclophosphamide에 의해 유발된 흉선세포의 apoptosis

구현옥 · 권창희 · 조준형 · 정상희 · 박신자 · 김윤배 · 양재만 · 이영순

Thymocyte Apoptosis Induced by Cyclophosphamide in Rats

Hyun-Ok Ku, Chang-Hee Kweon, Joon-Hyoung Cho, Sang-Hee Jeong, Shin-Ja Park*,
Yun-Bae Kim**, Jae-Mam Yang*** and Yong-Soon Lee***

Veterinary Research Institute, RDA, 480, Anyang-6-Dong, Anyang, 430-016, Korea

*Department of Chemistry, Kyongi University, Suwon, 440-270, Korea

**Agency of Defense Development, P.O Box 35, Yuseong, Taejon 305-600, Korea

***College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

(Received March 17, 1997)

(Accepted April 2, 1997)

ABSTRACT : Cyclophosphamide(25, 50 or 100 mg/kg), orally administered to male Sprague-Dawley rats, caused a time- and dose-dependent thymic atrophy. In the light microscopic examination of the atrophic thymus, thymocytes with condensed or fragmented nucleus were multifocally observed in the cortical region, started to increase 8 hr after CPA treatment and reached to the maximal level at 16 hr, although such cells were not seen after 48 hr when the severe depletion of thymocytes were marked. In agarose gel electrophoresis to analyze the DNA changes, DNA extracted from atrophic thymus showed a oligonucleosomal laddering at the corresponding time to morphological changes. In an additional supportive experiment, thymocytes showing morphological changes, nuclear condensation or apoptotic body, exhibited a positive reaction to immunoperoxidase staining using in situ apoptosis detection kit. Separately, agarose gel electrophoresis of DNA from bone marrow cells was performed to investigate the involvement of bone marrow cells in the process of thymocyte apoptosis. Although DNA laddering was slightly increased 2 and 4 hr after treatment, no clear correlation was inferred. Taken together, it is concluded that thymocytes showing morphological changes in thymic atrophy induced by cyclophosphamide administration represent an apoptosis having biochemical nature of programmed cell death.

Key Words : Cyclophosphamide, Thymic atrophy, Apoptosis.

I. 서 론

1965년 Kerr는 간문맥 결찰에 의해 일어나는 괴사를 coagulative necrosis와 구분하여 shrinkage necrosis라고 불렀다(Kerr, 1965, 1969, 1971). 그리고 이러한 shrinkage necrosis는 1972년에 Kerr, Wyllie 및 Currie 등에 의해 apoptosis로 명명되어지면서 형태학적 및 생화학적으로 괴사와 구분되는 programmed cell death의 일종이라고 하였다(Ueda등, 1994; Wyllie등, 1973, 1980). 즉 괴사의 경우는 화학물질 중독증, 심한 저산소증 및 광범위한 외상 등의 외부자극에 대해 인접세포에 영향을 미치며 수동적으로 일어나는 급성 세포사(acute cell death)인데 비해 apoptosis는 생리적으로 또는 외부자극에 대해 산재성으로 그리고 개별적으로 일어나는

능동적인 세포사(programmed cell death)로 표현된다 (Alberts등, 1994; Kane, 1995; Majno등, 1995; Ueda등, 1994).

Apoptosis는 성장인자(growth factor)의 소멸이나 DNA장애에 의한 종양억제유전자인 p53의 발현, death receptor의 활성화 또는 대사나 세포주기의 장애 등에 의해 신호되어 endonuclease의 활성화 및 세포표면의 변화 또는 세포구조의 재구성 등의 과정을 통해 진행되며, apoptosis가 일어나고 있는 세포는 인접세포나 탐식 세포에 의해 인지되어 탐식소화된다(Boudreau등, 1995; Hernandez-caselles등, 1993; Kerr등, 1994; Mountz등, 1994; Nagata등, 1995; Steller등, 1995; Thompson, 1995). 이러한 apoptosis의 과정은 세포생존(cell survival)에 관여하는 bcl2 gene과 세포사망(cell death)에 관

여하는 *bax gene*에 의하여 조절된다(Bissonnette등, 1992; Hockenbery등, 1990; Kerr등, 1994; Mountz등, 1994; Reed, 1994; Sentman등 1991; Steller등, 1995; Strasser등, 1991; Thompson, 1995; Veis등, 1993). Apoptosis는 정상적인 생리현상으로 embryonic morphogenesis, metamorphosis, 홍선의 림프구 성숙 등에 중요한 역할을 하며(Kerr등, 1991; Meyn등, 1994; Naruse등, 1994), 병리적으로는 종양, 자가면역병, 후천성 면역결핍증, 노인성 질환 등에서 주로 관찰되는데, 이러한 질환은 정상적으로 생체내 항상성을 유지하기 위한 세포증식 및 세포사의 균형이 깨져 유발되는 것으로 알려져 있다(Thompson, 1995; Ueda등, 1994). 또한 apoptosis는 호르몬 결핍, 방사선, 독소, 바이러스 감염 및 화학요법제와 같은 수많은 외인성 물질에 의해서 유도된다(Blanco등, 1995; Cohen등, 1984; Compton등, 1986; Lundberg등, 1991; Meyn등, 1994; Mountz등, 1994; Sun등, 1992, 1993; Thompson, 1995; Tomei등, 1988; Wyllie등, 1982; Zucker등, 1994). 특히 암과 암치료의 측면에서 apoptosis가 활발히 연구되고 있으며(Kerr등, 1994), 암치료를 위한 화학요법제로 널리 사용되고 있는 etoposide를 비롯하여 cisplatin, doxorubicin, bleomycin, cytosine, arabinoside, nitrogen mustard, methotrexate, vincristine등이 apoptosis를 유발한다고 보고되고 있다(Kerr등, 1994; Thompson, 1995). 그리고 이러한 화학요법제들은 종양조직뿐만 아니라 정상세포에서도 apoptosis를 유발하는 것으로 알려졌다(Meyn 등, 1993). 홍선에서는 생리적 퇴화(negative selection)중인 미성숙 홍선세포의 제거시 뿐만 아니라 합성 글루코코르티코이드, 환경독성물질 및 화학요법제 등에 노출됨으로써 미성숙 홍선세포에서 apoptosis가 유발된다(Bertrand등, 1991; Blankenship등, 1994; Corcoran등, 1994; Sun등, 1994; Thomson등, 1991). 그리고 화학요법제인 cyclophosphamide는 마우스의 홍선세포나 종양세포에서 apoptosis를 유발한다고 보고된 바 있다(Meyn등, 1994; Naruse등, 1994).

실험동물이 화학물질에 노출되는 경우는 간장애뿐만 아니라 종종 홍선위축이 일어나며(Comment등, 1992), 화학물질에 의한 홍선위축은 림프성 세포의 소실, 홍선의 상피성 기질의 장애 또는 골수의 stem cell에의 영향에 의한 prothymocytes의 이동감소 등의 기전에 의해 유발되는 것으로 제안되었다(Aguilar등, 1994; Beschoner등, 1990; Fine등, 1990; Maestroni등, 1994; Pieter등, 1992; Sun등, 1994). Etoposide에 의한 랫드에서의 홍선위축은 apoptosis에 의한 홍선 상피성 림프구의 소실에 의해 유발된다고 보고되었으며

(Corcoran등, 1994; Naruse등, 1994; Onishi등, 1993; Sun등, 1994), etoposide에 의한 혈액학적 독성은 골수내의 T 림프구의 apoptosis와 관련있을 것으로 추정되었다(Maestroni등, 1994). 홍선위축은 형태학적으로 미성숙 홍선세포의 소실에 따라 피질부가 얇아져 체중에 대한 홍선의 상대중량비가 감소하는 것이 특징으로(Comment등, 1991; Sun등, 1994; Waal등, 1992), 홍선의 형태학적 변화 및 홍선의 체중에 대한 상대중량을 홍선위축의 지표로 많이 이용하고 있다.

Apoptosis는 형태학적으로 핵의 변화가 특징적이다. 즉 염색질이 농축되어 핵막의 가장자리에 초생달 모양으로 분포하거나 절단되어 관찰되며 세포질 및 세포용적이 감소하여 주사현미경 관찰에 의하면 세포표면이 울퉁불퉁하게 보인다(Sorenson등, 1990; Ueda등, 1994; Wyllie등, 1980). 이러한 세포들의 세포소기관의 형태나 기능은 정상적으로 유지되며 절단된 염색질은 세포막에 의해 잘 둘러싸여 apoptotic body를 형성한다(Ueda등, 1994). 그리고 apoptosis가 일어나고 있는 세포는 인접세포 또는 탐식세포에 의해 탐식소화되나, 이때 괴사와는 달리 염증반응을 동반하지 않는 것이 특징이다(Fukuda등 1993; Meyn등, 1994; Naruse등, 1994; Sun등, 1994; Tomei등, 1991; Ueda등, 1994; Zucker등, 1994). 근본적인 apoptosis의 생화학적 변화는 핵염색질의 구조적 변화이다. 이러한 구조적 변화는 apoptosis유발요인에 의한 세포질내 칼슘이온의 증가에 따른 칼슘 의존성 효소인 endonuclease의 활성화로 숙주(host) DNA가 180내지 200개 염기쌍이하의 oligonucleosome길이의 DNA fragment로 절단됨으로써 agarose gel에 전기영동시 oligonucleosomal laddering을 나타내는 것이다. 반면에 괴사로 인한 pyknotic nuclei의 경우는 전기영동시 DNA가 smear형태로 관찰되므로 생화학적으로 괴사와의 감별이 가능하다.

조직표본에서 apoptotic nuclei를 확인하기 위한 방법으로는 *in situ* apoptosis detection kit가 널리 사용되는데, ApopTag *in situ* apoptosis detection kit-peroxidase는 apoptotic nuclei에 고농도로 존재하는 3'-OH말단에 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)의 촉매작용으로 digoxigenin-nucleotide를 반응시켜 antidigoxigenin 항체 반응을 유도하는 방법이다(Oncor사, 1994).

암치료를 위해 화학요법제로 널리 사용되고 있는 cyclophosphamide가 면역기능을 억제할뿐만 아니라 골수조혈기능도 억제한다고 보고되고 있으며(Ballantyne등, 1993), cyclophosphamide에 의한 시험관내 정상 및 암세포에서의 apoptosis는 많이 연구되어 왔으나 생체내에서 apoptosis에 대해 연구된 바는 드물다(Meyn등, 1994).

따라서 본 연구에서는 랫드에서 cyclophosphamide에 의해 유발되는 흉선위축이 생체내 흉선세포나 골수세포의 apoptosis와 관련있는지를 형태학적 및 생화학적 기법을 이용하여 살펴보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

수의과학연구소의 SPF실험동물 사육실로부터 분양 받은 3-4주 Sprague-Dawley 수컷 랫드를 실험실환경에 적응시킨 후 4-5주령에 실험을 실시하였다. 실험실내 환경조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$ 그리고 조명은 12시간간격의 점·소등을 유지하였다. 그리고 실험동물은 polycarbonate cage에 넣어 사료(신촌사료)와 음수(수돗물)를 자유로이 급여하였다.

2. 시험물질 투여 및 시료 채취

Cyclophosphamide(CPA, Sigma)에 의해 흉선위축과 흉선세포의 apoptosis가 유발되는지 알아보기 위해 CPA(25, 50 또는 100 mg/kg)를 증류수에 녹인 후 10 ml/kg의 양으로 각각 5수의 랫드에 1회 경구투여하였다. CPA투여 후 24, 48 및 72시간에 ether마취하에서 부검하여 복대동맥으로부터 방혈한 후 흉선을 채취하여 중량을 측정한 후 1/4은 광학 현미경적 관찰을 위해 10% 중성포르말린에 고정하였으며, 나머지 1/2은 DNA fragment의 분석용으로 -70°C 냉동고에 동결보존하였다. 또 흉선위축과 골수세포의 apoptosis유도와와의 관련성을 조사하기 위해 좌우측의 대퇴골을 적출하여 fetal bovine serum(Gibco) 4 ml로 관류시켜 골수를 채취하여 -70°C 냉동고에 동결보존하였다. 또한 CPA에 의해 유도되는 흉선세포의 apoptosis의 경시별 변화를 살펴보기 위해 CPA(100 mg/kg)를 5수의 랫드에 1회 경구투여후 0, 2, 4, 8 및 16시간에 부검하여 위에서와 같은 방법으로 흉선 및 골수를 채취하였다.

3. 흉선의 상대중량 산출

흉선의 상대중량은 흉선의 중량을 체중으로 나누어 백분율(%)로 산출하였다.

4. 흉선세포의 병리조직학적 관찰

10% 중성포르말린에 고정된 흉선은 탈수, 파라핀

침투 및 포매과정을 거친 후 조직절편을 제작하여 hematoxylin & eosin염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 흉선세포 및 골수세포의 DNA분석

-70°C 에 동결보존한 흉선과 골수를 10배의 lysis buffer용액(10 mmol/L Tris-HCl, 0.5% Triton X-100, 5 mmol/L ethylene diaminetetraacetic acid, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A, pH 8.0)에 재현탁시킨 후 37°C 에서 1시간 배양한 다음, proteinase K (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 37°C 에서 18시간동안 처리하였다. 이어서 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25/24/1)용액으로 2회 DNA를 추출한 후 chloroform/isoamylalcohol(24/1)로 phenol을 제거한 후 상층액 10 μl 를 취해 ethidium bromide(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 들어 있는 2% agarose gel(Nusieve, FMD)상에서 100 volt로 35분동안 전기영동을 하였다(Fukuda등, 1993; Sambrook등, 1989). 전기영동한 후 UV transilluminator로 비추어 1Kb DNA ladder (Gibco, BRL, USA)를 대조로 하여 DNA band를 확인하였다.

6. 흉선세포의 면역학적 관찰

10% 중성포르말린에 고정한 조직절편을 ApopTag *in situ* apoptosis detection kitperoxidase를 이용하여 apoptotic nuclei를 면역염색하였다. Apoptotic body에 고농도로 존재하는 3'-OH말단에 digoxigenin-nucleotide를 terminal deoxynucleotidyltransferase(TdT)의 촉매 작용에 의해 부착시킨 후 antidigoxigenin-peroxidase를 반응시켰다. 그리고 diaminobenzidine substrate solution으로 정색반응을 일으켰으며 methyl green으로 대조염색을 한 후 관찰하였다.

7. 자료의 통계처리

흉선의 상대중량 및 apoptotic thymocytes의 출현율(%)은 PCSTAT statistical package를 이용하여 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 유의성은 공히 95%($p < 0.05$) 및 99%($p < 0.01$)의 수준에서 검정하였다.

III. 결 과

1. Cyclophosphamide투여 후 체중에 대한 흉선의

상대중량 변화

CPA(25, 50 또는 100 mg/kg)를 랫드에 경구투여한 후 24, 48 및 72시간에 채취한 흉선의 체중에 대한 상대중량을 산출한 결과는 다음과 같다(Fig. 1). 즉, CPA 투여 후 흉선의 상대중량은 모든 용량에서 감소하는 추세를 보였다. 24시간에는 중간용량군(50 mg/kg) 및 고용량군(100 mg/kg)에서만 대조군의 0.322%에 비해 각각 0.185% 및 0.211%로 유의한 감소를 보였으며($p < 0.01$), 48시간 및 72시간에는 모든 용량군에서 유의하게 감소하여 흉선이 현저히 위축되었다($p < 0.01$). CPA (100 mg/kg)투여 후 경시별 흉선의 상대중량은 16시간에 0.218%로 대조군의 0.323%에 비해 유의하게 감소

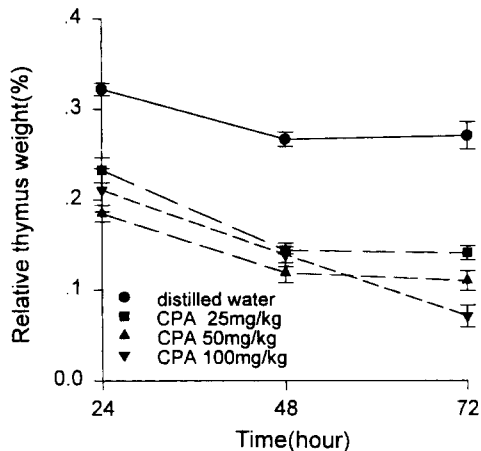


Fig. 1. Dose-dependent changes of relative thymus weight in the rat treated with cyclophosphamide(CPA). Relative thymus weight was expressed as a percentage of thymus weight per body weight.

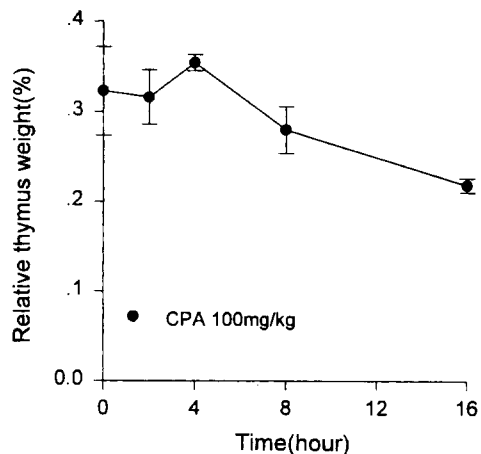


Fig. 2. Time-dependent changes of relative thymus weight in the rat treated with cyclophosphamide(CPA, 100 mg/kg). Relative thymus weight was expressed as a percentage of thymus weight per body weight.

하였다($p < 0.05$)(Fig. 2).

2. Cyclophosphamide투여 후 흉선세포의 조직병리학적 변화

CPA(25, 50 또는 100 mg/kg)를 랫드에 1회 경구투여한 후 24, 48 및 72시간에 흉선을 채취하여 조직절편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과 투여후 24시간에 모든 용량군에서 apoptosis의 특징인 핵의 농축(condensation) 또는 분절(fragmentation)을 나타내는 흉선세포들이 피질에서 다소성(multifocal)으로 주위조직과 분리되어 starry sky모양으로 나타났으나 용량별로 현저한 차이는 보이지 않았다. 반면 CPA투여 후 48 및 72시간에는 피질의 흉선세포들이 거의 소실되어 피질부가 명확하게 구분되지 않았으며 피질에 비해 수질이 넓게 분포하는 것으로 보였으나 apoptotic thymocyte들은 거의 관찰되지 않았다.

그러나, CPA(100 mg/kg)를 투여한 단기간의 경시별 변화에서 투여 후 2시간 및 4시간에는 특징적인 형태학적 변화가 관찰되지 않았으나 8시간에 흉선의 피막하의 피질에서 흉선세포의 핵이 농축되어 관찰되기 시작하여 투여후 16시간에 피질에서 다소성으로 핵이 농축 및 분절된 흉선세포가 다수 관찰되었다(Fig. 3).

3. Cyclophosphamide투여 후 흉선세포 및 골수세포의 DNA의 전기영동상

흉선세포의 핵농축이나 분절의 형태학적 변화는 programmed cell death에 의한 핵염색질의 구조적 변화에 의해 것인지를 확인하기 위하여 CPA투여 후 흉선세포에서 추출한 DNA를 2% agarose gel상에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 결과 24시간에는 대조군을 제외하고 25, 50 및 100 mg/kg의 모든 용량군에서, DNA band의 density에는 다소 차이가 있으나 oligonucleosomal laddering이 관찰되었다. 그러나 48시간 이후에는 대조군을 비롯하여 모든 용량군에서 DNA laddering이 나타나지 않았다(Fig. 4). CPA(100 mg/kg)를 투여한 경시별 시험에서는 2시간 및 4시간에는 대조군과 마찬가지로 DNA laddering이 나타나지 않았으나 형태학적 변화가 뚜렷한 8시간 및 16시간에 DNA laddering을 보였다(Fig. 5).

한편 흉선위축이 골수세포의 apoptosis와 관련있는지를 조사하기 위해 골수세포에서 분리한 DNA를 위의 방법으로 전기영동한 결과 대조군에서 oligonucle-

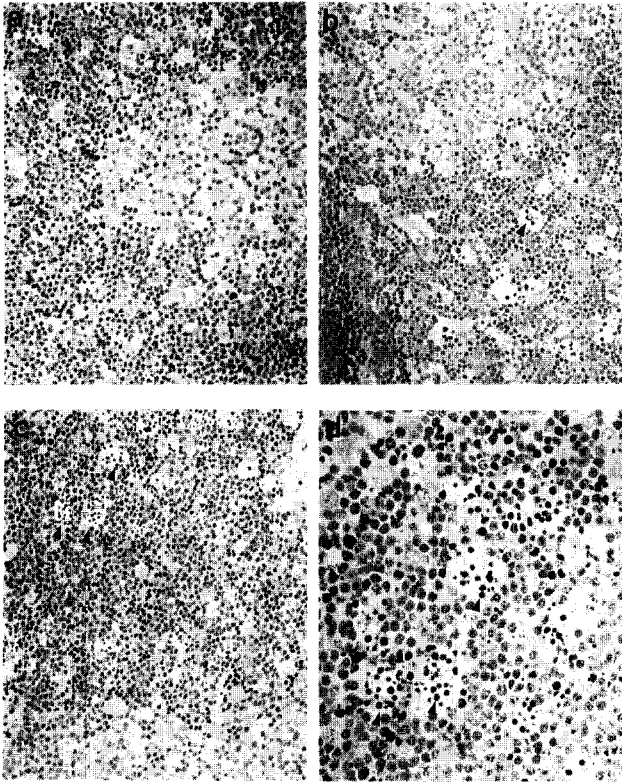


Fig. 3. Histopathology of rat thymus following the treatment of cyclophosphamide (100 mg/kg). H&E stain, X200. (a) 4 hr; (b) 8 hr; (c) 16 hr after the treatment of CPA; (d) higher magnification of c, X400. Thymocytes with condensed or fragmented nucleus were observed(arrowhead).

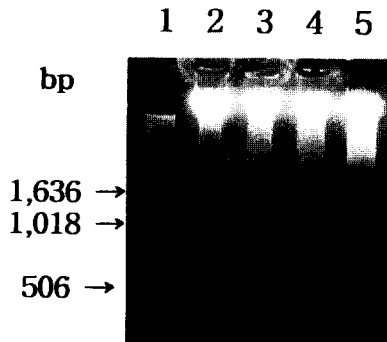


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from rat thymus 24 hr after the treatment of cyclophosphamide(CPA). Lane 1, DNA size marker(1 Kb ladder); lane 2, vehicle control (distilled water); lane 3, 4 and 5: 25, 50 and 100 mg/kg of CPA, respectively.

eosomal laddering이 관찰되었으며 CPA(100 mg/kg)투여 후 2시간 및 4시간에는 대조군에 비해 density가 높은 DNA band가 특징적이었으나(Fig. 6), 투여 후 8시간 및 16시간에는 대조군의 DNA band 정도로 관찰되거나 DNA band가 관찰되지 않았다. 그리고 CPA투여 후 24시간 이후에는 대조를 제외하고 모든 용량군에서

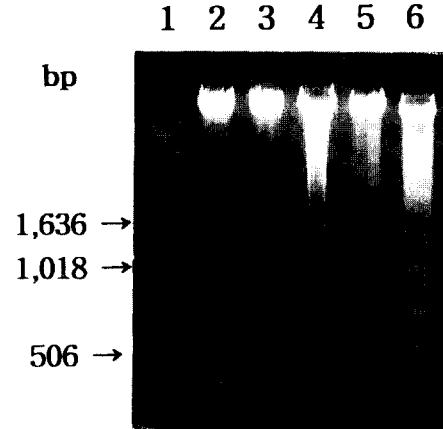


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from rat thymus after the treatment of cyclophosphamide(CPA, 100 mg/kg). Lane 1, DNA size marker(1Kb ladder); lane 2, 3, 4, 5 and 6: 0, 2, 4, 8 and 16 hr after dosing with CPA, respectively.

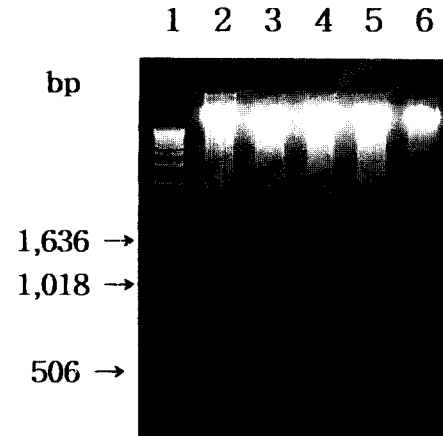


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from bone marrow cells after the treatment of cyclophosphamide(CPA, 100 mg/kg). Lane 1, DNA size marker(1 Kb ladder); lane 2, 3, 4, 5 and 6: 0, 2, 4, 8 and 16 hr after dosing with CPA, respectively.

DNA laddering이 관찰되지 않았다.

4. Cyclophosphamide투여 후 흉선세포의 면역염색상

10% 중성포르말린에 고정된 조직절편을 ApopTag *in situ* apoptosis detection kit-peroxidase를 이용하여 면역염색한 결과 CPA(100 mg/kg)투여후 16시간에 대조군에 비해 핵이나 핵주위가 갈색으로 염색되는 양성반응을 보이는 세포가 증가하였으며 이러한 양성반응은 hematoxylin & eosin염색에서 관찰된 starry sky영역에서 나타났다(Fig. 7). 그러나 흉선에서 형태학적 변화가 나타나는 모든 starry sky영역에서 양성반응을 보이지는 않았다. 즉, 형태학적으로 핵농축을 보이는 세포보다는 핵의 분절내지는 apoptotic body를 나타내는 세포

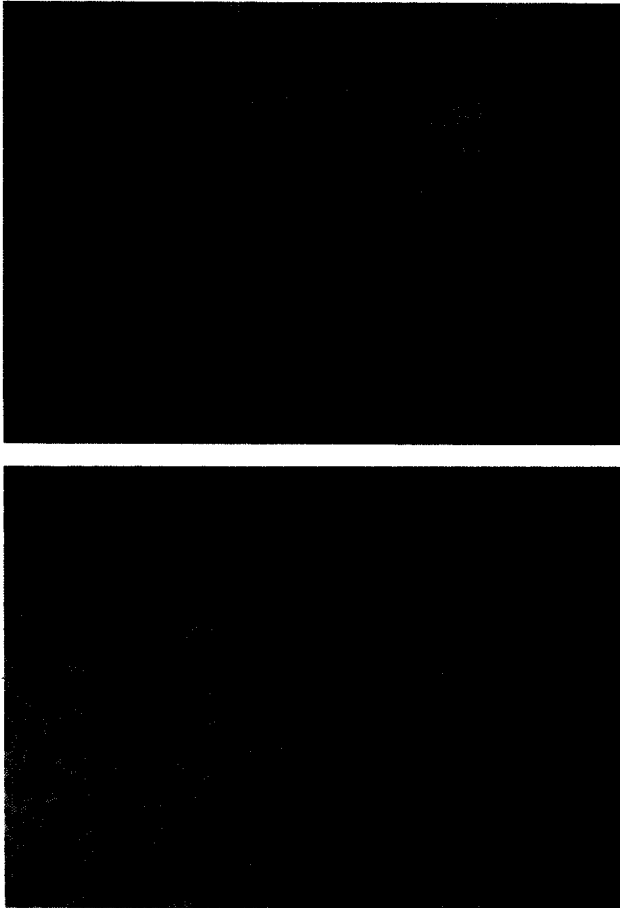


Fig. 7. Immunoperoxidase staining of apoptotic thymocytes after the treatment with cyclophosphamide(CPA, 100 mg/kg). Methyl green counterstain. X400. (a), 0 hr; (b), 16 hr after the treatment of CPA. Apoptotic thymocytes with a positive reaction were observed (arrowhead).

들에서 강한 염색상을 보여 주었다.

IV. 고 찰

흉선위축은 형태학적으로 수질에 비해 미성숙 흉선 세포가 많이 분포하는 피질의 감소 또는 소실과 체중에 대한 상대중량의 감소가 특징적이다(Comment등, 1992; Fine등, 1990; Sun등, 1994; Waal등, 1992). 본 연구에서도 cyclophosphamide(CPA)투여에 의해 24시간에는 흉선의 체중에 대한 상대중량이 50 mg/kg이상의 용량에서 대조군에 비해 유의하게 감소($p < 0.01$)한 후 48시간 및 72시간에서는 모든 용량군에서 계속 감소하여 흉선이 현저히 위축되었다($p < 0.01$). 이러한 결과는 etoposide를 투여한 랫드에서의 흉선위축과 유사하였다(Sun등, 1994).

Apoptosis가 일어나고 있는 세포의 특징적인 형태학

적 변화는 핵염색질이 농축되어 덩어리를 형성하거나 한쪽으로 편중되어 관찰되며 세포용적이 감소하고 세포표면의 microvilli의 소실등이 일어나는 것이 특징적이다. 이와 같이 농축되고 편중된 핵은 절단되어 재구성된 세포막으로 잘 둘러싸인 apoptotic body를 형성한다(Cohen등, 1992; Comment등, 1992; Meyn등, 1994; Sun등, 1992; Wyllie등, 1984). CPA(25, 50 또는 100 mg/kg)투여 후 24시간에 모든 용량군에서 농축된 핵을 가진 apoptotic thymocyte들이 관찰되었으며, 고용량(100 mg/kg)의 CPA를 투여한 후의 경시별 변화에서는 apoptotic thymocyte들이 8시간에 나타나기 시작하여($p < 0.05$) 투여 후 16시간까지 지속되었다($p < 0.01$). 핵이 농축(condensed)된 흉선세포는 피질에서 다소성으로 나타났다. 이러한 결과는 랫드에 etoposide를 투여한 후 흉선에서 핵이 농축된 흉선세포가 나타나는 형태학적 변화와 유사하였으며 마우스에 CPA를 투여한 후 나타나는 흉선의 형태학적 변화와 일치하였다(Naruse등, 1994; Sun등, 1994).

주지하는 바와 같이 apoptosis는 염색질의 형태학적 변화가 특징적이며(Naruse등, 1994; Tomei등, 1991), 이러한 형태의 염색질 변화는 DNA구조의 생화학적 변화(laddering)를 동반한다. 화학요법제, 호르몬 및 방사선 등의 여러가지 apoptosis유발인자에 노출시 apoptotic nuclei promoting activity(ANPA)가 유도되며(Chow등, 1995), 그 결과 세포내 칼슘의 증가로 endonuclease가 활성화되어 host DNA를 180내지 200개 염기쌍의 oligonucleosome길이의 DNA fragment로 절단되어 oligonucleosomal laddering이 나타나며, 이러한 DNA laddering은 apoptosis의 생화학적 지표로 이용되고 있다(Ueda등, 1994). 본 연구에서도 흉선세포에서 DNA를 추출하여 2% agarose gel에 전기영동하여 본 결과 DNA fragment의 용량별 및 경시별 변화를 보였다. CPA에 의한 형태학적 변화와 마찬가지로 용량별 변화는 투여 후 24시간에 25, 50 및 100 mg/kg에서 DNA band의 density는 다소 차이를 보였으나 모든 용량군에서 oligonucleosomal laddering을 보였으며 경시별 변화에서도 투여 후 8시간에 미약한 DNA laddering이 관찰되었으며 16시간에서는 뚜렷한 DNA laddering이 관찰되었다. 이러한 결과는 CPA(200 mg/kg)를 마우스(ICR strain)에 투여한 후 24시간에 DNA laddering이 나타났다는 보고와 유사하였으며(Naruse등, 1994), 본 연구에서는 200 mg/kg보다 낮은 용량인 25, 50 및 100 mg/kg의 용량에서 투여후 24시간에 DNA laddering이 관찰되는 것으로 보아 25 mg/kg이상에서 충분히 apoptosis가 유도되는 것으로 생각된다.

DNA분석에 이어서 ApopTag *in situ* apoptosis detection kit-peroxidase를 이용하여 특이적인 면역염색을 한 결과에 의해서도 CPA에 의해 형태학적 변화가 일어나고 있는 흉선세포가 양성반응을 보임으로써 흉선세포의 apoptosis가 확인되었다.

세포사망과정에서 DNA가 endonuclease의 작용으로 일정부위에서 절단되어 agarose gel전기영동상에서 oligonucleosomal laddering의 형태를 나타내는 세포들은 특징적인 형태학적 apoptosis를 보여주며, 이러한 DNA 형태변화는 염증시 나타나는 lysosome관련 급성세포사시의 DNA변화와 구분됨으로써 두가지 세포사를 구분하는 지표로 사용되어 왔다. 그러나 세포사유발요인의 자극강도에 따라 세포사의 형태가 달라지거나 세포사의 경시별 변화가 있을 수 있기 때문에 apoptosis에 이어 necrosis로 이어지는 일련의 과정으로 해석하려는 주장이 제기되고 있다(Cohen 등, 1992; Naruse 등, 1994).

CPA에 의한 흉선세포에서의 apoptosis는 형태학적 및 생화학적으로 보아 랫드에서는 8시간경에 유도되어 24시간까지 지속되는 것으로 보이며 용량에 따라 정도는 다르지만 모든 용량군에서 관찰되었으며, 투여 후 48시간 및 72시간에는 거의 형태학적 변화를 아 볼 수 없었으며 피질의 흉선세포가 감소되어 피질과 수질이 명확하게 구분되지 않았다. 이러한 변화는 CPA에 의해 apoptosis가 유도되어 24시간까지 유지되며 48시간 및 72시간에는 심한 피질의 감소가 관찰되며 이것은 흉선세포의 증식에 비해 흉선세포의 심한 소멸이나 골수에서의 prothymocytes의 이동감소 등에 의한 것으로 생각된다. 이러한 과정에서 CPA에 의한 골수세포에의 영향을 확인하기 위해 골수에서 분리한 DNA를 전기영동한 결과 대조군에 비하여 투여 후 2시간 및 4시간에 DNA laddering band의 density가 증가되기는 하였으나 대조군에 비해 현저한 차이가 없었다. 본 연구에서는 CPA에 의한 골수세포의 apoptosis 증가는 현저하지 않으나 일차적인 흉선세포의 apoptosis로 인한 심한 소멸에 더하여 골수내 stem cell의 수가 현저히 감소하여 골수조혈기능이 억제됨으로써 골수에서의 이동감소 또한 흉선위축과 관련이 있을 것으로 여겨진다.

CPA에 의해 암조직은 몇시간내에 apoptosis가 유도되어 8시간에서 12시간에 최고치에 이른다고 보고하였다(Meyn 등, 1994). 본 연구에서는 흉선세포의 apoptosis가 8시간경에 나타나기 시작하여 16시간경에 최고치에 이른 후 24시간까지 관찰되는 것으로 보아 암조직에서 일어나는 apoptosis와는 경시적으로 약간 차이가 있었으며, 방사선에 의한 apoptosis는 2시간 내지 3시간에 시작하여 4시간 내지 6시간에 최고치에 이른

후 24시간에는 정상치로 돌아온다는 보고(Meyn 등, 1994)보다는 늦게 유도되었다. 또 다른 항암제에 의해서는 2일 내지 3일에 apoptosis가 일어나며 이러한 apoptosis는 90% 세포치사농도에서 일어난다고 보고하였다(Meyn 등, 1994; Sorenson 등, 1990). CPA에 의한 apoptosis는 G2M phase에 유도되어 느린 세포사를 보이거나 세포주기와는 독립적으로 유도되어 빠른 세포사를 일으키는 것에 의해 신호되며 간장에서 활성화된 후 순환계를 통하여 정상 및 암조직에 이르며 이러한 약물효과는 모세혈관의 해부학적 분포와 생리학적 기능에 의존한다고 보고되고 있다(Raymond 등, 1994; Sorenson 등, 1990).

결론적으로 본 연구에서 CPA에 의해 유발된 흉선위축에서 흉선세포의 형태학적 변화는 programmed cell death의 생화학적 특성을 지니는 apoptosis라고 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 화학요법제(chemotherapeutic agent)인 cyclophosphamide(CPA)에 의해 일어나는 흉선위축이 흉선세포의 apoptosis와 관련이 있는지를 알아 보기 위해 수행하였다.

Sprague-Dawley 수컷 랫드에 CPA(25, 50 또는 100 mg/kg)투여 후 체중에 대한 흉선의 상대중량은 용량별 및 경시별 변화에서 대조군에 비해 유의하게 감소하여 흉선위축을 보였다($p < 0.01$). 위축된 흉선을 형태학적으로 관찰한 결과 CPA투여 후 8시간 부터 농축되거나 분절된 핵을 가진 전형적인 apoptotic thymocyte들이 피질부에서 다소성으로 관찰되기 시작하여($p < 0.05$) 16시간에 최고조에 달하여($p < 0.01$) 24시간까지 관찰되었으나, 48시간 이후에는 흉선세포가 심하게 소실되어 거의 관찰되지 않았고, 피질의 심한 위축으로 수질과의 구분이 명확하지 않았다. 이러한 형태학적 변화는 흉선세포에서 추출한 DNA를 agarose gel전기영동에 의한 생화학적 DNA분석 결과와도 일치하였다. CPA 투여 후 경시별 변화에서 8시간에 oligonucleosomal laddering이 미약하게 나타나기 시작하여 16시간에는 명확하였으며, 용량별로도 다소 차이는 있으나 24시간에 모든 용량군에서 DNA laddering이 관찰되었다. 이러한 형태학적 및 생화학적 변화는 *in situ* apoptosis detection kit를 이용한 면역염색 결과에 의해서도 양성 반응을 보였다.

한편 흉선위축이 골수세포의 apoptosis와 관련있는지 조사하기 위해 골수세포에서 분리한 DNA를 agarose gel에 전기영동한 결과는 CPA투여 후 2시간 및

4시간에 투여전에 비해 DNA laddering이 다소 증가되었으나 흉선위축과 골수세포의 apoptosis의 관련성은 명확히 규명되지 않았다.

결론적으로 랫드에서 CPA에 의해 유발된 흉선위축에서 관찰되는 흉선세포의 형태학적 변화는 programmed cell death의 생화학적 특성을 지니는 apoptosis라고 생각된다.

참고문헌

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1994): Molecular biology of the cell(Garland publishing, Inc., New York), 1173-1175.
- Aguilar, L. K., Aguilar-Cordova, E., Cartwright, J. and Belmont, J. W. (1994): Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.*, **152**, 2645-2651
- Ballantyne, B., Marrs, T. and Turner, P. (1993): General & applied toxicity(Stockton press, New York), 1060.
- Bertrand, R., Kerrigan, D., Sarang, M. and Pommier, Y. (1991): Cell death induced by topoisomerase inhibitors: Role of calcium in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 77-85, 1991.
- Beschorner, W. E. and Armas, O. A. (1991): Loss of medullary dendritic cells in the thymus after cyclosporine and irradiation. *Cell. Immunol.*, **132**, 505-514.
- Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R. (1992): Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*, **359**, 552-554.
- Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H. and Lotz, M. (1995): Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.*, **146**, 75-85.
- Blankenship, L. J., Manning, F. C. R., Orenstein, J. M. and Patierno, S. R. (1994): Apoptosis is the mode of cell death caused by carcinogenic chromium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **126**, 75-83.
- Boudreau, N., Sympson, C. J., Werb, Z. and Bissell, M. J. (1995): Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, **267**, 891-893.
- Chow, S. C., Weis, M., Kass, G. E. N., Holmstrom, T. H., Ericksson, J. E. and Orrenius, S. (1995): Involvement of multiple proteases during Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes. *FEBS Lett.*, **364**, 134-138.
- Cohen, G. M., Sun, X.-M., Snowden, R. T., Dinsdale D. and Skilleter, D. N. (1992): Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.*, **286**, 331-334.
- Cohen, J. J. and Duke, R. C. (1984): Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei lead to cell death. *J. Immunol.* **132**, 38-42.
- Comment, C. E., Blaylock, B. L., Germolec, D. R., Pollock, P. L., Kouchi, Y., Brown, H. W., Rosenthal, G. J. and Luster, M. I. (1992): Thymocyte injury after in vitro chemical exposure: Potential mechanism for thymic atrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 1267-1273.
- Compton, M. M. and Cidlowski, J. A. (1986): Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*, **118**, 38-45.
- Corcoran, G. B., Fix, L., Jones, D. P., Moslen, M. T., Nicotera, P., Oberhammer, F. A. and Buttyan R. (1994): Contemporary issues in toxicology apoptosis: Molecular control point in toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 169-181.
- Fine, J. S., Siverstone, A. E. and Gasiewicz, T. A. (1990): Impairment of prothymocyte activity by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Immunol.*, **144**, 1169-1176.
- Fukuda, K., Kojiro, M. and Chiu, J.-F. (1993): Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris Hepatoma 7777 tissue: Apoptosis or Necrosis. *Am. J. Pathol.*, **142**, 935-946.
- Hernandez-Caselles, T. and Stutman, O. (1993): Immune functions of tumor necrosis factor: 1. Tumor necrosis factor induces apoptosis of mouse thymocytes and can also stimulate or inhibit IL-6-induced proliferation depending on the concentration of mitogenic costimulation. *J. Immunol.*, **151**, 3999-4012.
- Hockenbery, D. (1995): Defining Apoptosis. *Am. J. Pathol.*, **146**, 16-19 .
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. and Korsmeyer, S. J. (1990): bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, **348**, 334- 336.
- Kane, A. B. (1995): Redefining cell death, *Am. J. Pathol.*, **146**, 1-2
- Kerr, J. F. R. (1965): A histochemical study of hypertrophy and ischemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Path. Bact.*, **90**, pp. 419-435.
- Kerr, J. F. R. (1969): An electron-microscope study of liver cell necrosis due to heliotrine. *J. Path.* **97**, 557-562.
- Kerr, J. F. R. (1971): Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Path.*, **105**, 13-20.

- Kerr, J. F. R. and Harmon, B. V. (1991): Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In apoptosis: The molecular basis of cell death (L. D. Tomei and F. O. Cope (eds)), (Cold Spring Harbor Laboratory press, New York), 5-25.
- Kerr, J. F. R. and Searle, J. (1972): A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J. Pathol.*, **107**, 41-44.
- Kerr, J. F. R., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. (1994): Apoptosis: It's significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**, 2013-2022.
- Lundberg, K. (1991): Dexamethasone and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin can induce thymic atrophy by different mechanisms in mice. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 16-23.
- Maestroni, G. J. M., Covacci, V. and Conti, A. (1994): Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* **54**, 2429-2432.
- Majno, G. and Joris, I. (1995): Apoptosis, Oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, **146**, 3-15.
- Meyn, R. E., Stephens, L. C., Hunter, N. R. and Milas, L. (1994): Introduction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **33**, 410-414.
- Mountz, J. D., Wu, J., Cheng, J. and Zhou, T. (1994): Autoimmune disease: A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum.*, **37**, 1415-1420.
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995): The fas Death factor. *Science*, **267**, 1449-1456.
- Naruse, I., Keino, H. and Kawarada, Y. (1994): Antibody against single-stranded DNA detects both programmed cell death and drug-induced apoptosis. *Histochemistry*, **101**, 73-78.
- Onishi, Y., Azuma, Y., Sato, Y., Mizuno, Y., Tadakuma, T. and Kizaki, H. (1993): Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1175**, 147-154.
- Pieters, R. H. H., Bol, M., Lam, B. W., Seinen, W. and Penninks, A. H. (1992): The organotin-induced thymus atrophy, characterized by depletion of CD4⁺CD8⁺ thymocytes, is preceded by a reduction of the immature CD4⁻CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ ^{low} CD2^{high} thymoblast subset. *Immunology*, **76**, 203-208.
- Reed, J. C. (1994): Mini-review: Cellular mechanisms of disease series. *J. cell Biol.*, **124**, 1-3
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory press, New York), 9.16-9.19.
- Sentman, C. L., Shutter, J. R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. and Korsmeyer, S. J. (1991): bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*, **67**, 879-888.
- Sorenson, C. M., Barry, M. A. and Eastman, A. (1990): Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J. Natl. cancer Inst.*, **82**, 749-754.
- Steller, H. (1995): Mechanisms and Genes of cellular suicide. *Science*, **267**, 1445-1449.
- Strasser, A., Harris, A. W. and Cory, S (1991): bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*, **67**, 889-899.
- Sun, X.-M., Carthew, P., Dinsdale, D., Snowden, R. T. and Cohen, G. M. (1994): The involvement of apoptosis in etoposide-induced thymic atrophy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 78-85.
- Sun, X.-M., Dinsdale, D., Snowden, R. T., Cohen, G. M. and Skilleter, D. N. (1992): Characterization of apoptosis in thymocytes isolated from dexamethasone-treated rats. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 2131-2137.
- Sun, X.-M., Snowden, R. T., Dinsdale, D., Ormerod, M. G. and Cohen, G. M. (1994): Changes in nuclear chromatin precede internucleosomal DNA cleavage in the induction of apoptosis by etoposide. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 187-195.
- Sun, X.-M., Snowden, R. T., Skilleter, D. N., Dinsdale, D., Ormerod, M. G. and Cohen, G. M. (1992): A flow cytometric method for the separation and quantitation of normal and apoptotic thymocytes. *Anal. Biochem.*, **204**, 351-356.
- Thompson, C. B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
- Thomson, A. W., Pugh-Humphreys, R. G. P. and Woo, J. (1991): The influence of FK 506 on the thymus: Implications of drug-induced injury to thymic epithelial cells. *Transplantation Proceedings*, **23**, 947-948.
- Tomei, L. D., Kanter, P. and Wenner, C. E. (1988): Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem. biophys. res. commun.*, **155**, 324-331.
- Ueda, N. and Shah, S. V. (1994): Apoptosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **124**, pp. 169-177.
- Veis, D. J., Sentman, C. L., Bach, E. A. and Korsmeyer, S. J. (1993): Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.*, **151**, 2546-2554.

- Waal, E. J. D., Schuurman, H.-J., Loeber, J. G., Loveren, H. V. and Vos, J. G. (1992): Alterations in the cortical thymic epithelium of rats after in vivo exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD): an (immuno)histological study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **115**, 80-88.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1973): Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J. Path.* **111**, 255-261.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R. (1980): Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Macaskill, I. A. M. and Currie A. R. (1973): Adrenocortical cell deletion: The role of ACTH. *J. Path.*, **111**, 85-94.
- Wyllie, A. H. and Morris, R. G. (1982): Hormone-induced cell death: Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am. J. Pathol.*, **109**, 78-87.
- Wyllie, A. H. and Morris, R. G., Smith, A. L. and Dunlop, D. (1984): Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Path.*, **142**, 67-77.
- Zucker, R. M., Elstein, K. H., Thomas, D. J. and Rogers, J. M. (1994): Tributyltin and dexamethasone induce apoptosis in Rat thymocytes by mutually antagonistic mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127**, 163-170.