

방사선에 조사된 인체세포주(A431)에서 형태학적 분석법과 생화학적 분석법을 이용한 방사선 유도 세포고사에 관한 연구

전남대학교병원 핵의학과, 동신전문대학 피부미용과¹

최근희¹ · 범희승 · 김지열

Studies on the Radiation Induced Apoptosis by Morphological and Biochemical Analysis in A431 Cells

Keun-Hee Choi, Ph.D.,¹ Hee-Seung Bom, M.D. and Ji-Yeul Kim, Ph.D.

Department of Nuclear Medicine, Chonnam University Hospital, Kwangju Korea;

Department of Skin Cosmetics, Dong Shin College,¹ Kwangju, Korea

Abstract

Purpose: We performed this study to evaluate the process of radiation induced apoptosis in A431 skin epithelial cancer cell line. **Materials and Methods:** Low to high dose radiation (0, 2, 5, 10, 25 Gy) was given to A431 cells by Cs-137 cell irradiator. Apoptosis was evaluated by cell morphology, dye exclusion test, and DNA laddering. **Results:** Cell viability decreased as the radiation dose increased. Number of apoptotic bodies increased as radiation dose increased. It increased most significantly at 12 hours after irradiation. Lactate dehydrogenase activity in culture medium increased according to radiation dose and time after irradiation. DNA ladders could be identified in irradiated cells, but, it had no correlation with radiation dose or time after irradiation. **Conclusion:** Radiation-induced apoptosis which was the main course of cell death in A431 cells could be analyzed quantitatively by counting apoptotic bodies under microscope. Apoptosis increased as radiation dose increased. (Korean J Nucl Med 1999;33:306-15)

Key Words: Radiation-induced apoptosis, A431 cell line, Apoptotic body, DNA ladder

서 론

피부는 우리 신체기관 가운데 가장 밖에 위치하고 있기 때문에 외부 물리적 요인, 예를 들면 방사

선, 자외선, 열 등에 의해서 피부 세포에 해로운 생물학적인 악영향을 미쳐 화상(sunburn), 광선각화증(actinic keratoses), 탄력섬유증(elastosis), 신생종양(cutaneous neoplasia) 등이 나타나게 된다. 이 가운데서도 특히 자외선을 비롯한 방사선이 정상 피부에서 표피의 각화(keratinization)시 나타나는 말기 분화현상과 같은 일종의 세포고사를 유도한다는 보고가 있다.¹⁾ 피부 세포가 290~320 nm에 해당되는 자외선 파장이나 2 Gy 이상의 전리방사선에 노출되면 일차적인 반응으로 화상을 입게 되고 피부암 유발을 촉진하게 된다.²⁾

Received Sep 21, 1998; revision accepted May 14, 1999
Corresponding Author: Hee-Seung Bom, M.D., Department of Nuclear Medicine, Chonnam University Hospital, 8 Hakdong, Kwangju 501-757, Korea
Tel: 82-62-220-5641, Fax: 82-62-232-0232

E-mail: hsbom@chonnam.chonnam.ac.kr

※ 본 연구는 1997년도 전남대학교 학술연구비를 지원받아 수행하였음.

1972년에 병리학자였던 Kerr 등³⁾은 퇴축 또는 발

생과정의 조직과 암 등 병리적인 조직의 변화를 현미경으로 자세히 관찰할 때 지금까지 세포사의 전형으로 알려져 온 괴사(necrosis)와는 다른 형태학적으로 특징적인 변화를 나타내는 세포사가 있다는 사실에 관심을 모아 영국의 암학회지에 처음으로 세포고사(apoptosis)라는 용어를 발표하였다. 그 후에도 지속적인 연구가 이루어져 왔으며, 최근에 들어서 방사선을 조사받은 각종 세포들이 세포사를 일으키는데 괴사와는 형태학적인 것뿐만 아니라 많은 생화학적 차이를 나타낸다고 보고되었다.⁴⁾ 결국 세포고사의 본질은 개체의 유지에 불필요한 세포 또는 위험한 세포가 죽도록 완전하게 제어되는 기작으로 세포의 발생, 분화, 면역과 관련된 여러 가지 생리적인 현상에 깊이 관여하고 있고,⁵⁾ 암세포의 발생과정, 약제나 방사선에 의한 살암세포과정 및 분화유도과정에 중요하여 암치료의 측면에서도 대단히 주목되고 있다.⁶⁻¹⁰⁾

세포고사에 대한 연구와 함께 이를 검출하고 판정하는 방법도 여러 가지로 개발되고 있다.¹¹⁾ 세포고사는 크게 세포의 형태학적인 변화와 생화학적인 변화로 나누어 확인할 수가 있는데 형태학적인 변화의 대표적인 것으로는 핵 크로마틴 구조의 응축과 세포고사 소체(apoptotic body)의 형성이다.¹²⁾ 색소염색성을 이용하거나 전자현미경, 형광현미경 등을 이용하여 이들을 관찰할 수가 있다.¹³⁾ 생화학적 변화의 대표적인 것으로는 게놈 DNA의 약 180bp 뉴클레오솜 단위로의 단편화와 세포막의 변화를 관찰하는 것인데 gel 전기영동법을 이용하여 DNA 단편화를 확인할 수가 있고,¹⁴⁾ 세포 배양액 가운데 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase: LDH) 활성도를 측정하므로 세포막의 변화를 관찰할 수 있다.¹⁵⁾ 세포고사에 대한 지금까지의 연구 대상이 주로 흉선세포, 면역세포, 상피세포, 조혈세포 등을 중심으로 연구되어져 왔을 뿐 피부 세포에서의 세포고사 연구는 많지 않고, 지금까지 보고된 자료를 보면 주로 자외선에 의한 세포고사 연구에 그치고 있다.^{16,17)} 최근 오존층의 파괴 또는 체르노빌 원전사고 등 여러 가지 환경요인에 의해 인류는 각종 방사선에 노출되어 피부질환이나 피부암의 발생율이 증가되고 있는데, 방사선 조사 후 피부 세포가 세포사에 이르는 정확

한 기작에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.¹⁸⁾

따라서 본 연구는 방사선 조사로 피부 세포가 세포고사라는 과정을 통하여 세포사에 이르는지를 확인하고, 피부 세포에서 방사선에 의해서 세포고사가 유도된다면 방사선 양과 방사선 조사 후 경과시간에 따라서 어떻게 변하는지를 밝혀보고자 하였다. 또한 세포고사를 연구하기 위해 최근에 개발된 여러 가지 실험 방법을 서로 비교함으로써, 세포고사를 정확하고 편리하게 연구할 수 있는 방법을 찾아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양(cell line culture)

한국세포주은행(Korea cell line bank: KCLB)으로부터 분양 받은 피부상피암 세포의 일종인 A431을 조직배양플라스크(T25 cm², Nunc)에 넣고 10% 우태아혈청이 첨가된 성장배지(growth medium, dulbecco's modified eagle medium: DMEM, GibcoBRL) 5 ml을 채운 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지는 1주일에 2회 교체하였고, 세포가 배양용기에 약 80%를 차지할 정도로 자랐을 때 계대배양을 시행하였다.

2. 방사선 조사(irradiation)

방사선 조사는 Cs-137 세포조사기(Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 이용하였고, 감마선(central dose rate=529 Gy/h)을 각각 0 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 25 Gy씩 조사하였다.

3. 세포수확(harvest)

방사선 조사 후 각각 4, 7, 12, 24시간이 지난 다음 세포(5×10⁶ cells/ml)를 모으기 위하여 0.25% 트립신을 처리하고 약 5분 후에 세포를 떼어내어 15 ml짜리 원심관에 옮겨 1,200 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다.

4. 방사선 조사 후 피부상피암 세포주(A431)에서 분염법(trypsin blue exclusion test)을 이용한 세포생존율의 변화

방사선 조사 후 일정 시간마다 세포를 추출하여 이 가운데서 100 μ l를 취하고 동량의 0.5% trypan blue 용액(최종 농도 30 μ g/ml, Sigma)과 잘 혼합한 다음 광학현미경 하에서 염색음성인 생존세포와 염색양성의 죽은 세포 수를 hemocytometer로 계수하였다.

5. 방사선 조사 후 피부상피암 세포의 핵의 변화를 수반한 세포고사 관찰

1) 형광염색(fluorescent stain)

추출한 세포를 PBS로 부유시켜 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 70% 알코올을 500 μ l 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에 방치한 다음 세포부유액 5 μ l와 세포를 염색하기 위하여 형광염색약(Hoest33342, Sigma) 2 μ l를 잘 혼합하여 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨려 커버글라스로 덮고 형광현미경으로 관찰하였다.

2) 형광현미경 관찰 및 고사세포수 계수

형광현미경으로 관찰을 할 경우 정상 세포는 핵의 모양이 크고 둥글며 단편이 생기지 않는데 비하여 고사세포는 핵이 여러 개의 작은 소체로 단편화가 일어나 모양이 일정하지 않다는 특징을 갖고 있어서 구분이 쉽다. 따라서 형광현미경하에서 정상 세포수 1,000개당 나타나는 고사세포수를 계수하였다.

6. 피부상피암 세포에서 방사선 조사 후 나타나는 세포막 변화와 세포고사 관찰

젖산탈수소효소(lactic dehydrogenase, 이하 LDH) 활성도를 측정하기 위하여 키트(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였다. 방사선 조사 후 시간별로 배양액을 취하여 1,500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 세포를 제거한 다음 PBS로 10배 희석하여 100 μ l씩을 96-well microtiter판에 옮겼다. 100 μ l의 반응 혼합액을 섞고 상온에서 30분간 둔

다음 자동효소면역측정기(ELISA processor II, Behring)를 이용하여 490 nm 파장에서 LDH 활성도를 측정하였다.

7. DNA ladder와 세포고사

1) DNA 추출

추출한 세포에 PBS를 8 ml 정도 넣고 1,400 rpm에서 5~10분 동안, 3회 원심분리 시켰다. 세포를 2 ml용 소형 원심분리관에 각각 1.5 ml씩 분주한 다음 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 보관된 검체를 꺼내어 0.2 M Na_2HPO_4 와 0.1 M citric acid를 192:8의 비율로 혼합한 용액을 각 시험관마다 40 μ l씩 넣고 실온에 1시간 두었다. 일정시간이 지난 후 10,000 rpm으로 10분동안 4 $^{\circ}$ C를 유지하며 원심분리하였다. 위 상층액을 새로운 소형 원심분리관에 옮기고 0.25% NP-40을 3 μ l씩 넣고 RNase A (10 mg/ml)를 3 μ l씩 넣어 잘 흔들어 준 다음 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 배양하였다. Proteinase K (10 mg/ml)를 3 μ l씩 첨가한 다음 50 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 방치하였다.

2) 전기영동

전기영동판에 TBE (Tris Boric acid EDTA) buffer (20X) 15 ml과 증류수 300 ml를 미리 만들어둔 agaros gel과 함께 넣고 50볼트로 2시간 동안 전기영동하였다. Ethidium bromide로 30분 동안 염색하여 사진촬영하였다.

8. 통계처리

각 실험군 간의 통계적 유의성은 SPSS 통계프로그램을 사용하여 MANOVA test에 의해 검정하였으며 P값 0.05 미만을 유의한 수준으로 판정하였다.

결 과

1. 피부상피암 세포주(A431)에 방사선 조사 후 세포 생존율의 변화와 세포고사

방사선 양에 따른 그리고 방사선 조사 후 시간에 따른 세포 생존율의 변화를 관찰하기 위하여 분염법을 시행한 결과 방사선량별로, 그리고 방사선 조사 후 시간에 따라서 세포 생존율이 감소됨을 확인하였

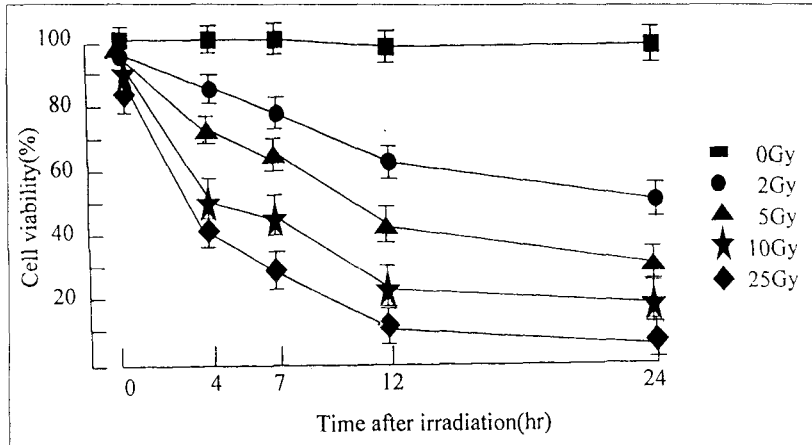


Fig. 1. Radiation-induced cell death assayed by trypan blue exclusion test according to radiation dose in A431 cells. Cell viability decreased as the radiation dose increased.

다(Fig. 1). 방사선을 5 Gy 조사한 군에서는 12시간이 지나면서 세포 생존율이 유의하게($p < 0.01$) 감소되는 반면에, 2 Gy, 10 Gy, 25 Gy를 조사한 실험군에서는 시간이 지남에 따라서 세포사가 일정한 비율로 나타나지만 24시간 이후부터는 큰 변화가 없었다.

2. 방사선 조사 후 피부상피암 세포에서 핵의 변화를 수반한 세포고사

세포고사가 유도될 때 가장 확실하게 나타나는 형태학적인 변화가 바로 세포고사 소체의 출현이었다(Fig. 2). 방사선 양별로 조사한 실험군에서 나타나는 세포고사 소체(%)는 대조군에 비하여 시간이 경과되면서 출현율이 증가하였으며, 특히 방사선 조사 후 12시간에서 유의하게($p < 0.01$) 증가 되었다(Fig. 3).

3. 피부상피암 세포에서 방사선 조사 후 나타나는 세포막 변화와 세포고사(Fig. 4)

방사선을 조사하지 않은 대조군의 LDH 활성도는 0.2 ± 0.05 인 데 비해 방사선을 조사했을 경우 점점 증가하여 25 Gy 조사 24시간에는 2.5 ± 0.1 로 증가하였다($p < 0.01$).

4. DNA ladder와 세포고사

피부상피암 세포에 방사선을 2 Gy 조사한 다음 4시간에 해당되는 실험군에서는 전기영동상에 ladder

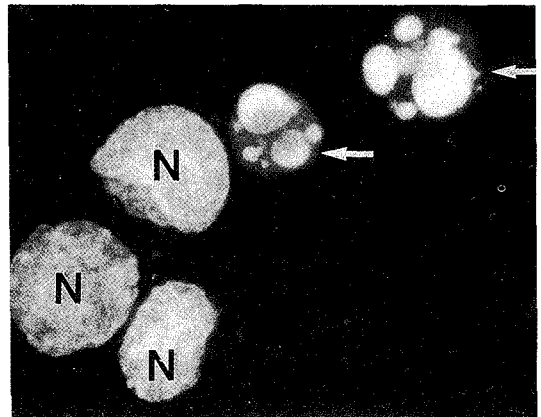


Fig. 2. Microscopic photograph of A431 cells stained with Hoescht 33342 fluorescent dye 12 hours after 10 Gy irradiation. Apoptotic cells (indicated by white arrows) are shown as densely condensed chromatin. N: normal cell.

가 관찰되지 않았는데 12시간 경과된 실험군에서는 ladder를 확인할 수 있었다. 한편 5 Gy, 10 Gy, 25 Gy를 조사한 실험군에서는 방사선 조사 후 4시간부터 ladder를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

본 논문은 피부상피암 세포주 일종인 A431세포가 감마선에 조사되었을 때 주로 세포고사를 통해

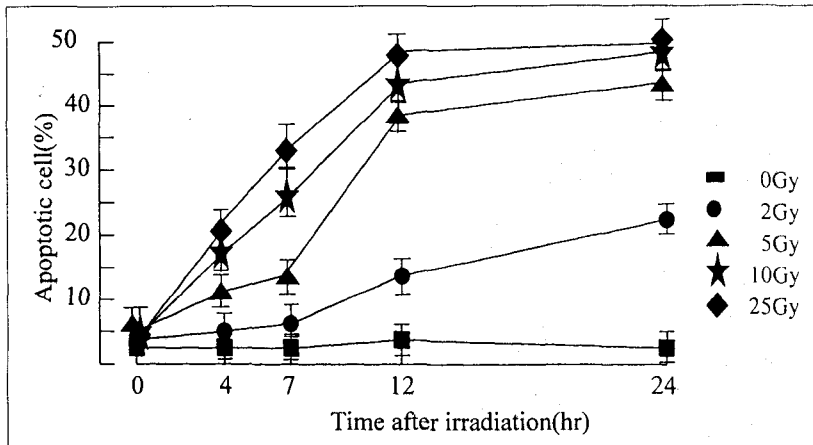


Fig. 3. Changes of the number of apoptotic cells at different time passage after irradiation. Apoptotic cells increased with radiation doses and time passage after irradiation.

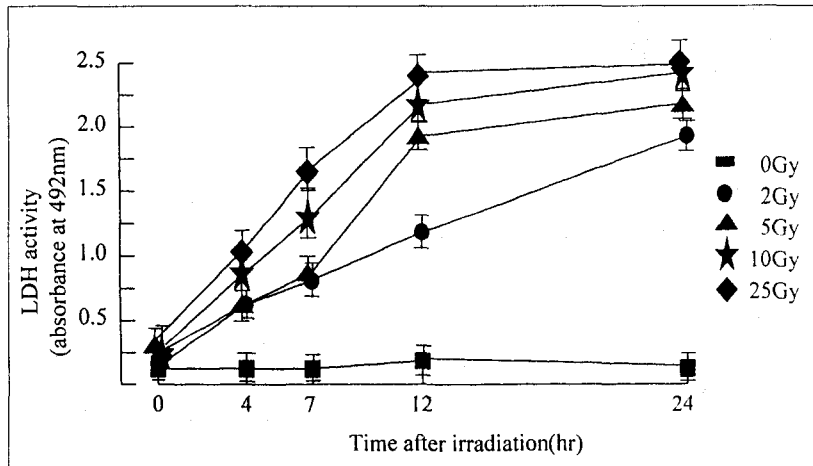


Fig. 4. Changes of LDH activity according to radiation dose and time passage after irradiation in A431 cells.

세포사에 빠진다는 사실을 형태학적 및 생화학적 실험방법을 통해 처음으로 증명하였으며, 이러한 실험 방법은 세포고사를 빠른 시간 내에 확인할 수 있는 편리한 실험방법임을 밝혔다.

방사선에 의해서 세포손상이 일어난다는 것은 잘 알려진 사실이다,⁷⁾ 방사선은 에너지의 흐름으로 이 에너지의 일부가 세포에 흡수될 때 생물 손상작용이 시작된다.¹⁹⁾ 세포의 중요 구성분자인 DNA 등에 직접 에너지가 흡수되면 DNA가 절단되고 최종적으로

는 세포장해를 일으키게 되는데 이러한 경우를 직접 작용이라고 한다. 한편, 세포구성 성분의 약 80%가 물인데 세포에 흡수된 방사선 에너지의 대부분이 물에 흡수되어 활성산소와 같은 유해한 자유유리기를 만들어 DNA와 세포소기관에 손상을 유발하는 과정도 있는데 이를 간접작용이라고 한다.²⁰⁾ 방사선에 의한 세포의 손상은 이러한 간접작용에 의해서 더 많이 유발된다. 각종 방사선에 의한 피부 노화나 피부암의 발생기작 가운데 하나인 자유유리기 이론에

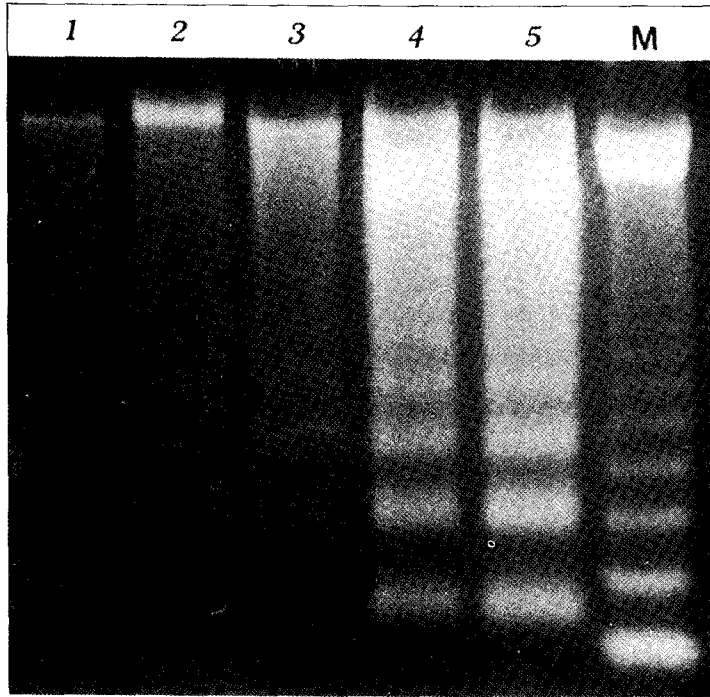


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis with ethidium bromide which depicts the DNA fragment characteristic of apoptosis. DNA was isolated from growing A431 cells, irradiated as following: 1; control, 2; 2 Gy, 4 hr, 3; 5 Gy, 4 hr, 4; 10 Gy, 12 hr, 5; 25 Gy, 24 hr, M: DNA marker (123 ladders).

의하면 방사선으로부터 나오는 에너지가 피부조직에서 자유유리기를 형성하여 DNA를 비롯한 단백질, 지질 등을 손상시켜 여러 가지 병리현상을 일으킨다는 것이다.²¹⁾

방사선에 의하여 세포사가 유도되었을 경우 문제는 살아있는 세포와 죽은세포를 구분하는 것이다. 세포사의 판정법 가운데 분염법이 일반적으로 사용되고 있는데, 살아 있는 세포의 세포막은 색소를 투과시키지 않으나 세포가 죽게되면 막의 투과성이 변하여 색소가 세포 내로 들어가 염색이 된다. 여러 가지 색소가 사용되나 일반적으로 trypan blue와 neutral red 염색약을 사용하고 있다.²²⁾ 본 실험에서도 trypan blue 염색약을 사용하여 A431 세포에 방사선을 조사하고 시간이 지남에 따라 나타나는 세포 생존율의 변화를 관찰해 보았다. 방사선량이 0, 2, 5, 10, 25 Gy로 증가될수록, 그리고 방사선 조사 후 시간이 4, 7, 12, 24시간으로 경과됨에 따라서 세포생

존율이 감소됨을 확인하였다. 이 결과는 다른 세포를 이용한 지금까지의 보고와 일치하는 것이다. 인체 상피세포에서도 방사선 조사 후 시간의 경과와 함께 세포 생존율이 감소됨이 보고되었다.²³⁾ 인체 위점막 상피암세포에서도 방사선량이 2, 4, 6, 8, 10, 12 Gy로 증가될수록 생존율은 감소되었고,²⁴⁾ 방사선을 조사한 생체 내(in vivo), 실험관 외(in vitro) 실험 결과를 토대로 만든 linear quadratic model에서도 유사한 결과를 나타내고 있다.²⁵⁾ Mouse fibrosarcoma (L929), myeloid leukaemia (HL-60), human epithelial like liver cells (Chang)에서 전리 방사선에 의해 유도되는 세포사를 연구한 결과 선량에 의존하여 세포사가 증가한 반면 생존율은 같은 비율로 감소됨을 보고 하였다.²⁵⁾ 피부상피암 세포에서도 자외선 B (280~320 nm) 조사에 의한 세포사 연구결과 자외선 조사량과 조사 후 경과 시간에 의해 세포 생존율이 결정되었다.²⁷⁾

결국 방사선 조사로 인하여 피부 세포의 생존율의 감소는 피부 세포의 세포사가 증가된다는 결과로 볼 수 있는데 본 연구자는 과연 피부 세포에서 방사선 조사로 인한 세포사가 세포고사에 의한 과정인지를 알아보기 위하여 먼저 핵의 변화를 관찰하였다. 세포고사는 세포막과 핵내의 구조변화를 동반한 세포크기의 축소로부터 시작된다는 것이 특징이다.²⁸⁾ 핵에는 DNA와 단백질의 복합체인 크로마틴이 망상구조로 되어 있는데 이것이 응축되어 모이게 되며 초기에는 특히 핵막주변에 반월상태로 응축이 된다. 핵농축이 일어남과 함께 핵의 미세구조가 소실되고 세포 전체의 크기가 축소된다. 이러한 변화와 함께 세포표면이 부풀려 핵과 세포에 크고 작은 돌기가 생겨 작게 찢겨 세포가 단편화되면서 막에 싸인 크고 작은 둥근 모양의 소포가 되는데 이것을 세포고사 소체라고 한다.²⁹⁾ 방사선을 5 Gy 조사한 다음 시간에 따라서 세포고사 소체수를 계수한 결과 대조군(1~3%)에 비하여 시간이 4, 7, 12, 24시간이 경과되면서 출현율이 증가되며 특히 방사선 조사 후 12시간에서 급격하게 증가되는 결과는 12시간에 세포 생존율이 급격하게 감소되는 결과와 연관성이 있음을 시사하였다. 그러나 5 Gy 조사 후 12시간에서 색소염색성 배제 시험을 통한 세포사망률이 약 63%로 나타났는데 실지로 같은 시간에 관찰된 세포고사 소체수는 약 40%이므로 나머지 23%에 해당되는 세포는 세포괴사나 또는 또 다른 과정을 통하여 세포사에 이르는지에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다. Yanagihara 등²⁴⁾은 인체 위점막암 세포에 감마선을 2, 4, 6, 8, 10, 12 Gy 조사한 후 형광염색약으로 염색하여 고사세포수를 관찰한 결과 방사선 양과 방사선 조사 후 12, 24, 48, 72시간에 비례하여 고사세포율이 증가된다고 보고하였을 뿐 세포 생존율과의 관계는 보고하지 않았다. 방사선에 의해 유도되는 세포고사 연구의 진형이 바로 흉선세포로 알려져 있는데,³⁰⁾ Valerie 등³¹⁾은 포유류의 흉선세포에 Cs-137 감마선을 6Gy 조사한 후 5, 10, 12 시간으로 시간이 경과됨에 따라서 세포고사 소체와 DNA 단편화가 증가되며, 생존율 감소정도와 비례하여 세포고사가 유도되는 것으로 보아 흉선세포에 있어서 세포사는 세포고사에 의해서 이루어짐을 알

수 있고 이러한 현상은 세포의 종류에 따라서 다소 차이가 있을 것으로 사료되었다. 포유동물의 ovarian carcinoma와 hepatocellular carcinoma cell line에 2.5~25 Gy까지 방사선을 조사하고 0.5~24시간까지 세포고사소체 출현을 조사한 결과에서도 방사선 양에 비례하고 조사 후 6시간에 가장 최고치를 나타냈다.³²⁾ 증식과 분화가 활발한 세포, 예를 들면 편역세포, 뇌신경세포, 소장상피세포, 조혈세포는 대부분 방사선에 민감한 영향을 받기 때문에 방사선유도 세포고사 연구는 주로 이러한 세포를 중심으로 이루어져 왔다. 여러 가지 세포에 따라 같은 방사선 양이지만 고사세포율이 각기 달리 보고되고 있는데,³³⁾ 이는 세포고사가 세포종류, 세포주기, 유도인자 등에 따라서 영향을 받을 수 있음을 시사하고 있다. 세포고사 소체수의 계수를 위해서는 핵을 염색할 수 있는 형광염색약을 사용하기 때문에 세포와 반응시킨 형광물질이 소멸되기 전에 가능한한 빨리 형광현미경 관찰이 필요하다는 단점이 있으나 세포고사를 단시간 내에 정확하게 정량분석할 수 있는 방법으로 생각되었다.

또한 세포가 방사선에 조사를 받아 세포사를 일으키게 되면 세포막의 투과성이 변하고 세포막을 이루고 있는 크고작은 분자들이 빠져나오게 되는데, 그 가운데서도 일반적으로 분자량이 큰 젖산탈수소효소의 세포외 방출을 지표로 하여 세포사를 확인하였다. 그 결과 방사선을 조사하지 않은 대조군의 LDH 활성도는 0.08~0.2인 데 비해 방사선을 5 Gy 조사했을 경우 4시간부터 증가하기 시작하여 12시간에 급격히 증가하여 24시간에는 2.3 ± 0.05 로 나타났다. 방사선량과 조사 후 시간에 따라서 LDH 활성도가 증가한 것으로 보아서 방사선 조사로 세포사가 유도됨을 재확인하였다. 한편, LDH 활성도의 증가는 세포괴사와 고사의 경우 모두 나타나는 현상이므로 세포고사에서만 특이하게 나타나는 기타 실험방법과의 비교분석도 필요할 것으로 사료되었다. 김등²⁷⁾도 피부상피암 세포에 자외선 조사 후 LDH 활성도를 측정된 결과 자외선 조사량에 비례하여 LDH의 활성도가 0.5~2.5까지 증가하고 이러한 증가는 자외선 조사 후 3시간부터 시작하여 18시간에 가장 높게 나타난다는 유사한 결과를 보고하였다.

방사선에 의해 세포고사가 유도될 경우 핵의 변화가 가장 특징적으로 일어나게 되고 그 결과 나타나는 세포고사소체 안에 응축된 크로마틴이 들어있는 경우가 있고 들어있지 않는 경우도 있다. 세포에 따라서 또는 세포고사 유도인자에 따라서 이러한 세포고사 소체를 만들지 않지만 핵의 단편화가 나타나는 경우도 있고,³⁴⁾ 세포고사 소체는 형성하지만 핵의 단편화는 나타나지 않는 경우도 있다.³⁵⁾ 이러한 DNA의 단편화 과정에는 핵산 분해 효소가 관여한다는 보고가 많다.³⁶⁾ 피부상피암 세포에 방사선을 조사했을 경우 세포고사 소체가 출현하였고 이와 함께 DNA 단편화가 나타나는지를 알아보기 위하여, 그리고 이와 같은 현상이 방사선량과 방사선 조사 후 경과시간과 관련되어 특이적으로 나타나는지를 확인하기 위하여 전기영동을 실시한 결과 2 Gy를 조사한 실험군에서는 12시간 경과 후에 ladder를 확인할 수 있었으며, 5 Gy, 10 Gy, 25 Gy 조사군에서는 4시간부터 ladder를 확인할 수 있었다. 그러나 시간과 선량에 따른 상관관계는 관찰할 수 없었다. 보다 특이적인 DNA ladder를 관찰하기 위해서는 고사세포만을 따로 분리하여 DNA 단편화를 정량화하는 방법³⁷⁾을 함께 병행한다면 보다 정확하게 세포고사가 확인될 것이다. DNA 단편화를 수반하지 않는 세포고사에 대한 보고도 있지만 지금까지 많은 연구자들이 세포고사시 나타나는 DNA ladder를 관찰하였다. 사람 림프종에서 방사선을 2 Gy 조사한 후 24시간에 ladder를 확인하였으며,³⁸⁾ 감마선에 조사된 사람 말초혈액 림프구에서 DNA ladder가 관찰되었으며,⁴⁾ 발생 중인 배세포에서도 방사선 조사로 세포고사 소체와 ladder가 관찰됨을 보고하였다.²⁵⁾ A431 세포에서 자외선을 조사한 직후부터 ladder가 관찰된 것으로 보아 DNA ladder를 관찰하는 방법이 DNA 손상을 확인하는 예민한 방법임을 보고하였다.²⁷⁾ DNA ladder를 확인하기 위한 전기영동법은 실험과정이 복잡하고 시간소요가 많기 때문에 조작하는 도중에 나타나는 여러 가지 문제점으로 ladder를 관찰할 수 없는 경우가 많다. 예를 들면 DNA를 추출하는 과정에서 proteinase K를 처리하는 시간과 온도에 따라 단편화된 DNA의 추출이 안되는 경우가 많고 세정제(detergent)로 인체에 유해한 페놀을

사용하고 있다. DNA를 씻는 과정과 고정시키는 과정, 그리고 RNase를 처리하는 시간이 많이 소요되고 단계도 복잡하여 결과를 확인하기까지는 많은 시간이 소요되며 복잡한 과정이 진행되는 동안에 DNA 단편화가 180 bp 이하로 이루어져 Ladder를 확인할 수 없게 된다. 따라서 본 실험에서는 기존의 방법을 보다 간단하게 수정하여 짧은 시간에 ladder를 확인하기 위하여 DNA를 추출하기 전에 Na_2HPO_4 와 citric acid의 혼합액을 첨가하고 세정제로 페놀 대신에 NP-40을 사용하며 RNase와 proteinase K를 동시에 처리하고 30분 후에 바로 전기영동을 걸을 수 있기 때문에 전체 5시간 경과후면 결과를 확인할 수 있으므로 앞으로 세포고사를 확인하는 간편한 방법으로 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 사료되었다. 한편, 방사선에 의해 DNA가 손상됨으로써 세포주기가 변하고 돌연변이가 유발되기도 한다. 이때 체내에서는 DNA 수복이나 세포고사와 같은 과정을 통하여 손상된 DNA를 제거하므로 생체를 보호한다고 알려져 있다.³⁹⁾

세포고사에 대한 여러 가지 검사법이 개발되었지만 피사와 고사를 확실히 구분할 수 있는 검사법은 아직 없는 실정이다. 본 연구에서도 피사와 고사를 구분하지 못하였는데, 앞으로 이 점에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

목적: 방사선 조사로 피부 세포가 세포고사라는 과정을 통하여 세포사에 이르는지를 확인하고, 피부 세포에서 방사선에 의해서 세포고사가 유도된다면 방사선 양과 방사선 조사 후 경과시간에 따라서 어떻게 변하는지를 밝혀보고자 하였다. 또한 세포고사를 연구하기 위해 형태학적인 분석법과 생화학적인 분석법을 서로 비교함으로써, 세포고사를 정확하고 편리하게 연구할 수 있는 방법을 찾아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 한국세포주은행으로부터 분양받은 피부상피암 세포의 일종인 A431을 Cs-137 세포조사기(Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 이용하여 0 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 25 Gy씩 조사하고 4, 7, 12, 24시간이 지난 다음 세포(5×10^6)

cells/ml)를 모아 분염법, 형광현미경에 의한 고사세포 관찰, 세포배양액의 젖산탈수소효소 활성도 측정, DNA ladder 관찰 등을 시행하였다. 각 실험군 간의 통계적 유의성은 SPSS 통계프로그램을 사용하여 MANOVA test에 의해 검정하였으며 P값 0.05 미만을 유의한 수준으로 판정하였다. **결과:** 방사선량에 따른 그리고 방사선 조사 후 시간에 따른 세포 생존율의 변화를 관찰하기 위하여 분염법을 시행한 결과 방사선량별로, 그리고 방사선 조사 후 시간에 따라서 세포생존율이 감소됨을 확인하였다. 세포고사가 유도될 때 가장 확실하게 나타나는 형태학적인 변화가 바로 세포고사 소체의 출현이었다. 방사선량별로 조사한 실험군에서 나타나는 세포고사 소체(%)는 대조군에 비하여 시간이 경과되면서 출현율이 증가하였으며, 특히 방사선 조사 후 12시간에서 유의하게 증가하였다. 방사선을 조사하지 않은 대조군의 LDH 활성도는 0.2 ± 0.05 인데 비해 방사선을 조사했을 경우 점점 증가하여 25 Gy 조사 24시간에는 2.5 ± 0.1 로 증가하였다($p < 0.01$). 피부상피암 세포에 방사선을 2 Gy 조사한 다음 4시간에 해당되는 실험군에서는 전기영동상에 ladder가 관찰되지 않았는데 12시간 경과된 실험군에서는 ladder를 확인할 수 있었다. 한편 5 Gy, 10 Gy, 25 Gy를 조사한 실험군에서는 방사선 조사 후 4시간부터 ladder를 확인할 수 있었다. **결론:** 피부상피암 세포에서 방사선에 의해 유도되는 세포사는 주로 세포고사를 통해 일어난다는 사실을 알 수 있었는데, 그 가운데서 DNA의 변화는 전기영동상의 ladder를 통하여 방사선 조사 후 4시간에서부터 관찰되었으며, 핵의 변화는 12시간에 큰 차이를 나타낸 것으로 보아 세포고사가 형태학적으로 관찰되기 전에 미리 세포고사에 관한 유전정보가 전달되었음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Weedon D, Searle J, Kerr JFR. Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol* 1979;1:133-44.
- 2) Bedford JS, Phil D. Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations.

- Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:1457-69.
- 3) Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J Pathol* 1972;107:41-4.
- 4) Chen YR, Meyer CF, Tan TH. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271:631-4.
- 5) Francis JC, Meredith AB, Young HK, Kwon TK, Albert AN. Anti-CD3-induced apoptosis in T-cells from young and old mice. *Cytometry* 1995; 20:33-42.
- 6) Song KY, Kang SM, Ha SW, Park SC. Morphological and biochemical study on the process of apoptosis induced by radiation. *Korean J Pathol* 1996;30:819-29.
- 7) Sankaranarayanan K, Chakraborty R. Cancer predisposition, radiosensitivity and the risk of radiation-induced cancers. I. Background. *Radiat Res* 1995;143:121-43.
- 8) Donaldson KL, Goolsby GL, Kiener PA, Wahl AF. Activation of p34cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Differ* 1994;5: 1041-50.
- 9) Akagi Y, Hirokawa Y, Fujita M, Kiriu H, Kashimoto K, Kasiwada K. Apoptosis in radiosensitive malignant tumors. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1993;53:1082-4.
- 10) Clifton CL, Min G, Chang HC, Thomas D. Radiation-induced apoptosis: Effects of cell age and dose fractionation. *Cancer Res* 1995;55:5207-12.
- 11) Woloschak GE, Changliu CM, Chung J, Liberton CR. Expression of enhanced spontaneous and gamma-ray-induced apoptosis by lymphocytes of the wasted mouse. *Int J Radiat Biol* 1996;69:47-55.
- 12) Jozo D, Michel M, Henri M. Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte r-irradiation-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biol* 1993;13:4875-83.
- 13) Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
- 14) Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochem* 1994;218:314-9.

- 15) Seamus JM, Chris PMR, Anne JM, James AR, Rob CAA, Drake ML, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-56.
- 16) Mark MC, Stephen HJ, John AC. Analysis of glucocorticoid actions on rat thymocyte deoxyribonucleic acid by fluorescence activated flow cytometry. *Endocrinol* 1988;122:2158-64.
- 17) Bories JC, Willerford DM, Grevin D, Davidson L, Camus A, Martin P, Stehelin D, et al. Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the ets-1 proto-oncogene. *Nature* 1995;377:150-5.
- 18) Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Goldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:147-56.
- 19) Kadhim MA, Lorimore SA, Townsend KMS, Goodhead DT, Buckle VJ, Wright EG. Radiation-induced genomic instability: delayed cytogenetic aberrations and apoptosis in primary human bone marrow cells. *Int J Radiat Biol* 1995;67:287-93.
- 20) 범희승. 방사선생물학. In: 고창순, 편자. *핵의학* 제2판. 서울: 고려의학; 1997. p. 193-234.
- 21) Harman D. A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
- 22) Minamoto M, Yamada M. *Experiment of apoptosis*. Tokyo: Yotosha; 1997.
- 23) Mothersill C, Seymour C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 1997;71:421-7.
- 24) Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S, et al. Radiation-induced apoptotic cell death in human gastric epithelial tumour cells; correlation between mitotic death and apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1995;67:677-85.
- 25) Clifton CL, Chen CH, Zvi F. An equation for the dose response of radiation-induced apoptosis: possible incorporation with the LQ model. *Radiation Therapy and Oncol* 1994;33:17-22.
- 26) Abend M, Rhein A, Gilbertz KP, Blakely WF. Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. *Int J Radiat Biol* 1995;67:315-26.
- 27) 김종순. A431 세포에서 자외선 Ultraviolet B 조사에 의한 세포사의 기전. *전남대학교 의과대학 박사학위 논문집*. 광주: 전남대학교 의과대학; 1996. p. 1-30.
- 28) Hisako N, Kunio S. X-ray-induced cell death: Apoptosis and Necrosis. *Radiat Res* 1994;140:1-9.
- 29) Wang B, Fujita K, Watanabe K, Mitani H, Yamada T, Shima A. Induction of apoptosis in cultured midbrain cells from embryonic mice. *Radiat Res* 1997;147:304-8.
- 30) Telford WG, King LE, Fraker PJ. Evaluation of glucocorticoid-induced dna fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif* 1991;24:447-59.
- 31) Valerie AF, Dennis RV, Priscilla AC, John JC, Donna LB, Peter MH. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
- 32) Clifton SL, Nancy RH, Kian KA, Luka M, Raymond EM. Development of apoptosis in irradiation murine tumors as a function of time and dose. *Radiat Res* 1993;135:75-80.
- 33) Nena M, Raymond EM, Nancy RH, Luka M. Radiation-induced apoptosis in a murine lymphoma in vivo. *Radioth and Oncol* 1994;33:11-6.
- 34) Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1992;61:451-3.
- 35) Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 1992; 286:331-4.
- 36) Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
- 37) Voehringer DW, Story MD, Oneil RG, Meyn RE. Modulating ca^{+2} in radiation-induced apoptosis suppresses DNA fragmentation but does not enhance clonogenic survival. *Int J Radiat Biol* 1997;71:237-43.
- 38) Bump EA, Braunhut SJ, Palayoor ST, Medeiros D, Lai LL, Cerce BA, et al. Novel concepts in modification of radiation sensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;15:249-53.
- 39) Woodcock A, Magnus IA. The sunburn cell in mouse skin: preliminary quantitative studies on its production. *Br J Dermatol* 1976;95:459-68.