

# 방사선조사 후 유포피암종세포내 칼슘농도의 변화와 apoptosis 발현에 관한 연구

문제운, 이삼선, 허민석, 최순철, 박태원, 유동수  
서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 치학연구소

## A study of the $[Ca^{2+}]$ and the Apoptosis of the KB Cell Lines after 10 Gy Irradiation

Je-Woon Moon, Sam-Sun Lee, Min-Suk Heo, Tae-Won Park, Dong-Soo You  
*Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute,  
College of Dentistry, Seoul National University*

**Purpose:** Ionizing radiations have been reported as an apoptosis initiating stimulus in various cells and it has established that sustained elevations in  $[Ca^{2+}]$  can lead to DNA fragmentation by  $Ca^{2+}$ -dependent endonucleases, ultimately resulting in apoptotic cell death. The previous experiments have been reported by using primarily thymocytes and lymphocytes and the change of  $[Ca^{2+}]$  was measured only by minutes or hours respectively. We need to evaluate  $[Ca^{2+}]$  in both several minutes and hours after irradiation of radiation of radiation therapy and verify the apoptotic cells.

**Materials and Methods:** We have measured  $[Ca^{2+}]$  in human gingival epitheloid cancer cell with 10 Gy irradiation, at minutely intervals and hourly intervals using digitized video-intensified fluorescence microscopy and the fluorescent  $Ca^{2+}$  indicator dye, fura-2. In order to find out that the transient rise in  $[Ca^{2+}]$  could induced apoptosis, cells were incubated for 1 hour at 37°C with TdT enzyme, rinsed and resuspended containing fluorescence and observed under a confocal fluorescence microscope. MTT assay was done to determine cell activity and LDH assay was done to determine the amount of necrotic cells.

**Results:** After irradiation, the transient and temporal increasing of  $[Ca^{2+}]$  in the KB cells was founded. Though, there was no change in the intracellular  $[Ca^{2+}]$  at 30 minutes and 2 hours after irradiation. We could detect of DNA fragmented cells at 4 hours after 10 Gy irradiated cells. There were no significant differences between 4 hour, 1 day, 3 day cells. There were no significant differences in MTT and LDH assay between the irradiated group and the control group after 4 hours and 1 day. Though after 3 days there were differences in MTT and LDH assay between the irradiated group was significantly decreased than the control group, in LDH assay the number of necrotic cell death of the irradiated was higher than the control group.

**Conclusion:** In KB cells there were incipient and temporal increasing of the  $[Ca^{2+}]$  with 10 Gy irradiation and the apoptosis was founded from 4 hours later which was earlier than seeing of the change of the amount of the cellular ability and necrosis. (*J Korean Oral Maxillofac Radiol 1999;29:105-117*)

**Key words :**  $[Ca^{2+}]$ , KB cell, irradiation, CLSM, apoptosis

접수일 : 1998년 12월 14일    채택일 : 1999년 1월 4일

\*이 논문은 1998년도 서울대학교병원 임상연구비지원에 의해 이루어진 것임.

## I. 서 론

apoptosis는 여러 세포에서 다양한 주변자극에 의하여 일어나는 세포사의 한 형태이다.<sup>1,2)</sup> apoptosis의 가장 두드러진 특징은 DNA의 분절로 DNA가 올리고뉴클레오솜으로 분리되어 결국 세포는 사멸하게 된다. apoptosis의 유발 요인으로는 여러 가지를 들 수 있는데 후천성면역결핍증이나 알츠하이머병 등에서 apoptosis가 증가되고 TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ ), 열, 종양억제제 중 일부도 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있으며<sup>3-7)</sup> 전리방사선이나, 종양괴사물질, 항암제에 의하여도 apoptosis가 일어날 수 있다.<sup>8-13)</sup> 방사선조사와 apoptosis간의 연관성에 대한 연구로 박 등<sup>14)</sup>은 구강내 유포피암종세포주에 방사선을 조사하고 유세포분석을 한 결과 조사량에 비례해서 pre-G1 peak가 증가함을 보고하였으며 Delic 등<sup>15)</sup>은 림프구에 2 Gy의 방사선조사 후에 apoptosis가 발생된 것을 보고하였고 Kubota 등<sup>16)</sup>은 폐포대식세포에서는 50 Gy 조사시에 apoptosis가 일어났음을 보고하였다.

칼슘은 세포의 정상적인 성장과정에 중요한 역할을 하며 방사선에 대한 세포반응에도 관여한다.<sup>17)</sup> 생체에 방사선이 조사되면 세포내에서 PKC(protein kinase C), tyrosine kinase 등이 연관된 여러 가지 신호전달체계가 자극된다.<sup>18-22)</sup> 일부 PKC는 칼슘이온에 의존적인 것으로 알려져 있으며 multidrug-resistant phenotype의 존재시 이러한 칼슘 의존적 PKC가 활성화된다는 보고도 있다.<sup>23)</sup> 이밖에 생체에 조사된 방사선은 생체내 물과 반응하여 hydroperoxyl 유리기와 과산화수소를 형성한다. 이러한 과산화물은 직접적으로 세포내 여러 단백질과 반응하여 구조를 변형시킬 수도 있으며 정확한 기전은 아직 알 수 없으나 칼슘이온의 증가를 일으킨다.<sup>24, 25)</sup> 이것은 주로 흉선세포와 림프구, HeLa 세포 등을 대상으로 연구되었는데 방사선 조사 후 수 분내에 일시적으로 혹은 수 시간까지 칼슘이온이 증가하였다는 보고가 있으나 칼슘이온 농도의 변화가 없

다는 보고도 있어 세포 종류에 따라 다양할 수 있음을 알 수 있다.<sup>26-29)</sup>

세포의 apoptosis가 일어나는 기전에 대하여는 정확히 알려지지 않았으나 크로마틴의 붕괴를 일으키는 엔도뉴클리아제가 칼슘이온에 의하여 활성화되며<sup>24, 26, 27)</sup> 종양괴사인자(tumor necrosis factor)가 세포내 칼슘의 농도를 증가시키고 이와 상호적으로 DNA 분절이 일어난다는 것으로 보아<sup>27)</sup> 칼슘이온이 apoptosis 유발과 관련이 있을 것으로 생각된다.

그러나 방사선조사 후에 나타나는 칼슘이온의 농도변화와 apoptosis를 동시에 연관시켜 연구한 경우는 매우 드물어 Ramakrishnan 등<sup>27)</sup>이 흉선세포에서 방사선조사 후 apoptosis의 증가와 함께 세포내 칼슘이온 농도도 증가함을 보고한 바 있을 뿐이다. 또한 지금까지 이루어진 연구는 주로 흉선세포와 림프구를 이용한 연구였을 뿐만 아니라 칼슘이온의 농도변화도 방사선조사 후 수 분내의 변화만을 측정하였거나 수 시간 후의 변화만을 측정하였을 뿐으로 수 분내와 수 시간 후의 변화를 계속적으로 관찰한 경우는 없었다. 따라서 실질적으로 방사선치료의 대상이 되는 암세포를 이용한 연구의 필요성이 있었으며 여러 시간 대에 따른 칼슘이온의 농도변화를 확인할 필요성이 있었다. 이에 이번 실험에서는 방사선을 구강에서 발생한 유포피암종세포주에 조사한 후 시간 경과에 따른 칼슘이온 농도의 변화를 알아보고 apoptosis의 발현 여부를 공초점레이저주사현미경(confocal laser scan microscopy; CLSM)으로 확인하여 방사선조사가 유포피암종세포주에서 시간 경과에 따라 칼슘농도의 변화를 일으키는 지 여부와 apoptosis의 유발 정도를 변화시키는 지를 알아보고자 하였다.

## II. 연구내용 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

세포주는 한국세포주은행에서 분양 받은 ATCC No. CCL17(KB cells)인 유포피암종세포주를 사용하였다. 이 세포는 배양용기 기저면에서 증식하는 특성을 갖고 있으며 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Media(DMEM, Gibco, USA)에 Fetal Bovine Serum(Gibco, USA) 10%와 Penicillin-Streptomycin 1%를 첨가하여 사용하였으며 100 mm dish의 배양용기를 사용하였고 세포배양기에서 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C 조건으로 배양하였다.

### 2. 방사선조사

세포내 칼슘이온의 농도 측정을 위하여 100 mm dish에서 배양된 KB 세포를 trypsin으로 처리하여 개개 세포로 분리한 후 10 ml tube에서 2 mM의 Fura-2 AM(Sigma, USA)으로 실온에서 40 분간 배양하여 Fura-2로 loading하고 배양용액으로 씻어내었다. Fura-2가 loading된 세포의 일부를 선택하여 Cs-137 방사선조사기(IBM 437C, USA)로 실온에서 5.38 Gy/min의 선량율로 10 Gy를 단일조사하였다.

### 3. 세포내 칼슘이온의 농도측정

방사선에 조사된 Fura-2로 loading된 세포를 측정 용기에 담고 역형광현미경 (inverse fluorescence microscope) 하에서 측정 대상 세포를 선택하였다. 발산되는 형광도의 변화를 현미경광도계 (microscope photometer, Model D10413, PTI, Canada)로 측정하여 칼슘이 결합되었을 때 340 nm에서 여기(excitation)하고 자유상태로 존재할 때 380 nm에서 여기되므로  $I_{340}/I_{380}$  비율로 칼슘농도 변화를 컴퓨터로 분석하였으며 방사선조사 3 분 후부터 10 분간 관찰하고 30 분 후와 2 시간 후의 결과를 관찰하였다. 칼슘농도는 실온에서 측정하였으며 용액은 DMEM에 2 mM의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 사용하

였다.

대조군도 동일한 과정으로 칼슘이온의 농도를 측정하였으며 측정된 대조군과 실험군의 형광도값간에 유의성있는 차이가 있는지를 t-test로 검정하였다.

### 4. apoptosis 검사

apoptosis 확인을 위하여 세포는 1-well chamber slide(Nunc, USA)에서 배양하였으며 방사선조사 전과 4 시간, 1 일 및 3일 후에 Apoptag(Oncor, USA)을 이용한 TUNEL (terminal deoxynucleotidyle transferase mediated dUTP nick end labeling) assay로 검사하였다. 검사하고자 하는 슬라이드를 10% 중성 포르말린용액에서 10 분간 고정하고 100% 에탄올로 5 분씩 3 회, 90%, 80%, 70% 에탄올로 각각 5 분간 1 회씩 고정하였다. 실온에서 proteinase K로 15 분간 처리하여 DNA를 naking 시키고 증류수로 수세 후 실온에서 equilibration buffer로 수세하였다. TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 효소를 넣고 37 °C에서 1 시간동안 배양하여 분절된 이중나선 DNA에 dNTP(deoxynucleotide triphosphate)를 부착시켜 수세 후 형광검출용액을 첨가하여 실온에서 30 분간 배양하여 형광을 발현시킨 후 PI(propidium iodide)로 염색하여 대조도를 높였다. 마운트하고 공초점레이저주사현미경(BIO-Rad, MRC1024)을 이용하여 DNA분절을 확인하였다. 사용한 공초점레이저주사현미경은 크롬-아르곤이온레이저로서 15 mW를 이용하였으며 488 nm에서 여기하였다. 100 배로 확대한 화면에서 하나의 슬라이드로부터 임의로 4개의 화면을 선택하여 PI로 염색된 전체 세포수 당 형광을 내는 세포수의 비를 관찰하여 DNA 분절을 보여주는 세포의 양을 측정하였다.

### 5. MTT 분석을 이용한 세포활성도 검사

MTT(3-[4,5-dimethylthiazol2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석을 위해 혈

구계를 이용하여 96 well-dish에  $1.5 \times 10^3$  개의 세포를 동일하게 넣은 뒤 1 일 배양하고 방사선 조사 4시간, 1 일, 3 일 후의 결과를 방사선을 조사하지 않은 대조군과 비교하였다. MTT 용액 (Sigma, USA)을 만들어 각 well에 50  $\mu$ 를 넣고 4 시간 후 제거한 뒤 formazon 결정을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 동일한 양으로 넣어 주었다. ELISA reader(Bio- tech, Instruments Inc. Model EL 308, USA)로 세포활성도를 파장 550 nm에서 측정하였다.

#### 6. LDH 분석

4 well dish에  $5 \times 10^3$  개의 세포를 넣어 1 일 배양 후 방사선조사 직전에 배양액을 교환하고 방사선조사 4 시간, 1 일, 3 일 후에 세포가 사멸하여 배양액내로 LDH(lactate dihydrogenase)가 분비되어 나온 양을 알아보았다. 상층액을 50  $\mu$  씩 96 well assay plate로 옮기고 LDH 분석 시약을 각 well에 50  $\mu$ 씩 넣어 실온의 암실에서 30 분간 배양하였다. 반응정지액을 넣고 ELISA reader로 490 nm에서 측정하였다.

### III. 연구성적

#### 1. 세포내 칼슘이온농도의 변화

방사선을 조사하지 않은 대조군에서는 시간이 경과되어도 칼슘농도비가 1.0 내외로 큰 변화를 보이지 않았으며 세포간에도 차이가 거의 없었다(Fig. 1,3). 10 Gy의 방사선을 조사한 세포에서는 78.9%(n=30/38)의 경우에서 방사선조사 4 분 후에 칼슘농도비가 급격한 증가를 보이다가 9 분 후쯤 대조군과 비슷한 수준의 농도비를 보였다 (Fig. 2,3). 방사선조사 후 칼슘이온의 증가를 보인 4 분에서 8 분사이의 결과를 방사선을 조사하지 않은 대조군과 비교시 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p<0.01, Fig. 3).

방사선조사 30 분 후와 2 시간 후에는 칼슘농도비가 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 1).

#### 2. 방사선조사 후 apoptosis의 발현

방사선조사 4 시간, 1 일, 3 일 후에 고정을 시작하여 apoptosis의 발현을 조사한 결과 4 시간 후에 apoptosis된 세포가 대조군에 비하여 유의성있게 증가되었으며 1 일과 3 일 후에도 대조

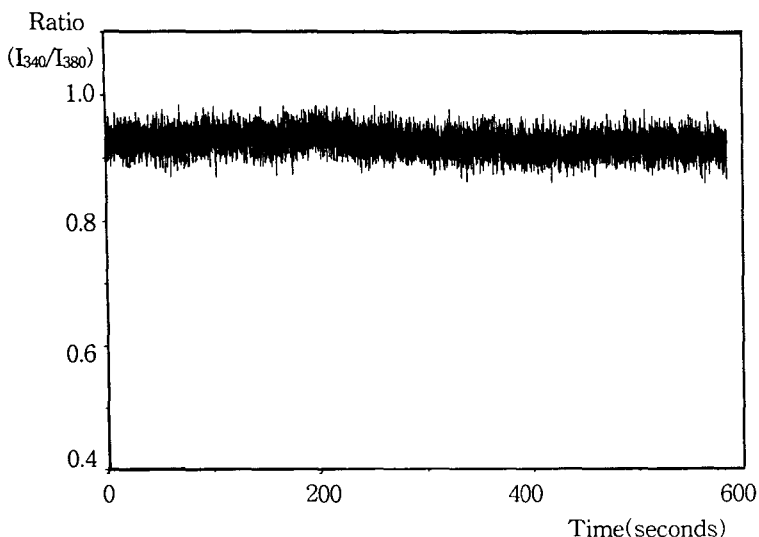


Fig. 1. One chart of intracellular  $[Ca^{2+}]$  ratio in fura-2-loaded control KB cells.

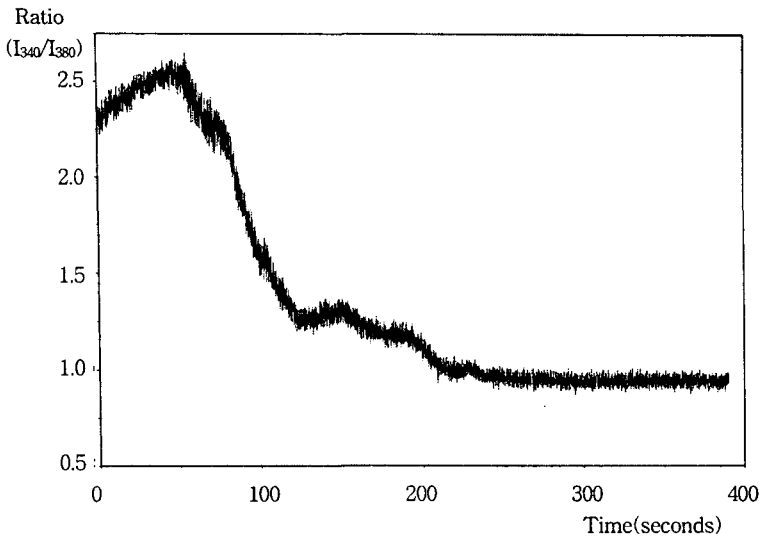


Fig. 2. One chart of radiation-induced change in  $[Ca^{2+}]$  in fura-2-loaded KB cells, 4 minutes after 10 Gy irradiation.

Table 1.  $[Ca^{2+}]$  ratio in fura-2-loaded KB cells at 30 minutes and 2 hours after 10 Gy irradiation

Groups	Time	
	30 minutes	2 hours
Control	$0.949 \pm 0.076$	$0.988 \pm 0.106$
Irradiated	$0.941 \pm 0.028$	$1.106 \pm 0.047$

mean  $\pm$  S. D. (n=30)

Table 2. The percentage of apoptotic cells on the slides detected CLSM (%)

Control	4 hours	1 day	3 days
$1.45 \pm 1.48$	$11.29 \pm 7.94^*$	$7.93 \pm 5.51^*$	$10.38 \pm 3.98^*$

mean  $\pm$  S. D. (n=5)

\* : statistically significant between control group and irradiated group ( $P < 0.01$ ).

군과 유의성있는 차이를 보였으나 실험군간에는 유의성있는 차이를 보이지 않았다(Table 2, Fig. 4-7).

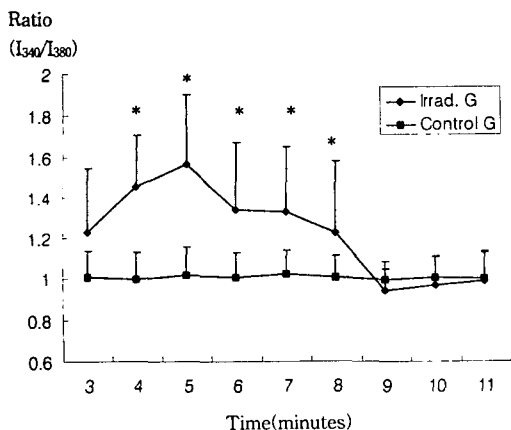
### 3. MTT 분석

방사선조사 4 시간과 1 일 후에는 대조군과 유의한 차이가 없었으나 방사선조사 3 일 후에는

대조군에 비하여 유의하게 작았다(Fig. 8).

### 4. LDH 분석

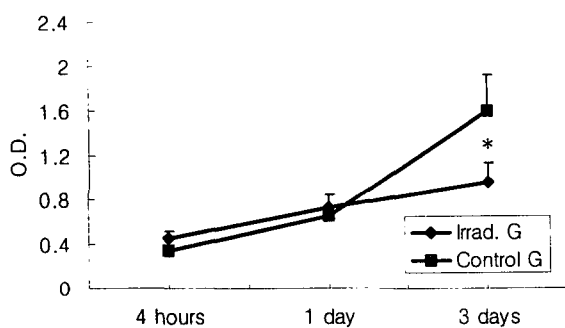
배지내의 사멸한 세포의 LDH 검사시 방사선 조사 4 시간 후와 1 일 후에는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나 3 일 후에는 방사선조사 군에서 유의하게 많았다(Fig. 9).



**Fig. 3.** Time course of radiation induced incipient changes in (Ca<sup>2+</sup>) ratio in fura-2-loaded KB cells.

\* : statistically significant between control group and irradiated group(P<0.01).

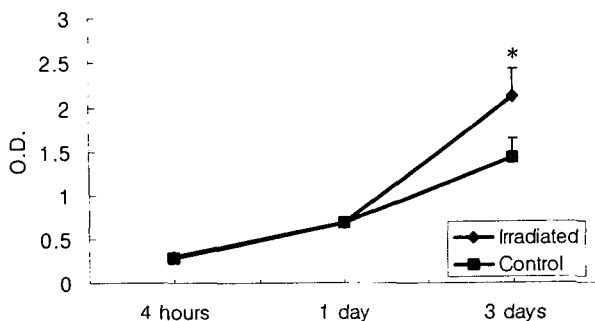
Error bars represent the standard deviation(n=30, respectively).



**Fig. 8.** Optical density signal after irradiation on KB cells by the MTT assay.

\* : statistically significant between control group and irradiated group(P<0.01).

Error bars represent the standard deviation(n=3).



**Fig. 9.** LDH concentration (O.D.) in supernatant after irradiation.

\* : statistically significant between control group and irradiated group(P<0.01).

Error bars represent the standard deviation(n=3).

#### IV. 총괄 및 고안

apoptosis 동안에 일어나는 핵의 분질이 칼슘이온에 의존적인 핵의 엔도뉴클리아제의 활동으로 일어난다는 것은 쥐의 흉선세포를 대상으로 한 연구에서 밝혀졌다.<sup>30-32)</sup> 이 효소들이 활성화되는 과정은 아직 알려져 있지 않으나 apoptosis 과정 중에 세포내 칼슘이온농도가 증가되었다는 보고가 있어<sup>33-35)</sup> 세포의 칼슘이온이 세포내로 유입되어 세포내의 칼슘이온의 농도가 증가되는 것이 apoptosis의 발현에 중요한 요건이라는 것을 알 수 있다. 또한 세포내의 칼슘이온농도의 항상성을 유지하는 데에는 원형질막이 중요한 역할을 하는데 방사선조사 후 증가되는 칼슘이온농도가 세포막의 변화에 기인하는 것이며 이것이 apoptosis와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>36-38)</sup> 즉 방사선조사 후 자극되는 apoptosis의 초기 변화는 세포막 수준에서 일어나는 작용물질이나 수용기가 중재된 과정이라고 생각된다. 이를 뒷받침하는 연구로 비타민 E 제제인 trolox로 세포막을 구조적, 기능적으로 유지시켰을 때 방사선조사 후에 흉선세포내의 칼슘이온농도의 항상성이 유지되었고 결과적으로 apoptosis가 억제되었다는 보고가 있다.<sup>27)</sup>

Ramakrishnan 등<sup>27)</sup>은 방사선조사 후 흉선세포에서 apoptosis의 발현은 6 시간까지 계속적으로 증가되었고 30 분 간격으로 측정된 세포내 칼슘이온농도는 방사선조사 2 시간 후에 크게 증가하여 3 시간 후에는 약 2 배에 달했다고 보고하였다. 또한 그들은 칼슘이온농도의 항상성을 유지시키는 약물을 방사선조사와 동시에 세포에 투여한 경우에는 apoptosis가 10% 이하로 감소되었으나 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간 이후에 투여한 경우에는 효과가 적었다고 하였다.<sup>27)</sup> 이와 같이 방사선조사 후에 활성화되는 칼슘 의존적 엔도뉴클리아제에 영향을 주는 칼슘이온의 농도변화는 방사선조사 후 짧은 시간 내에 일어나는 변화일 것으로 생각되며 이번 실험에서 관찰되었던 3 분에서 8 분사이의 일시적이고 즉각적

인 농도 증가로서 증명되었다고 생각된다. 그러나 방사선조사 후 림프구에서는 칼슘이온농도의 항상성이 변형되지 않았다는 보고가 있는데<sup>28,39)</sup> 그 이유는 이 연구에서는 방사선조사 30 분 이후부터 칼슘이온농도를 측정하였으므로 3 분에서 10 분 사이에 일어나는 결과가 간과되었기 때문이라고 생각된다. 반면에 HeLa 세포주에 방사선조사 후에는 즉시 일시적으로 칼슘이온의 증가가 일어났다는 보고가 있으나 이 연구에서는 12 분 이후의 농도변화에 대한 보고는 없었다<sup>29)</sup>. 이와 같이 칼슘이온의 농도변화에 대한 연구가 충분치 않은 이유는 정확한 측정이 쉽지 않기 때문으로 생각된다.

기존에 많이 사용하여 왔던 칼슘이온 detector인 quin2의 여러 단점들을 보완하여 새로이 합성한 Fura series는 salicylaldehyde의 유도체로서 p-hydroquinone 으로부터 합성된다. 이 새로운 Fura-2는 quin2에 비하여 여기와 방출이 좀 더 길어서 350 nm과 380-385 nm에서 민감하게 작용하므로 340과 350에서 갑자기 떨어지는 quin2에 비하여 형광현미경을 사용하기에 좀 더 간편하다. 또한 칼슘이온에 대한 친화력이 약 2 배에 달하여 적은 양의 칼슘이온농도를 인지할 수 있으며 다른 양이온에 비하여 칼슘이온에 선택적으로 결합하므로 마그네슘과 아연이온과 같은 세포내 양이온과의 결합을 배제할 수 있다.<sup>40)</sup>

KB 세포에서 방사선조사 후 칼슘이온농도 변화에 관한 보고는 아직 없었으므로 이번 연구에서는 KB 세포에서도 방사선조사 후 칼슘이온농도의 변화가 있는 지를 알아보고자 하였으며 이 실험을 통하여 방사선조사 직후 일시적인 칼슘농도의 증가가 있었음을 알 수 있었다. HeLa 세포주에서 나타났던 방사선조사 후 즉각적이며 일시적인 칼슘이온농도의 변화와 흉선세포에서 나타났던 수 시간 후까지의 지속적인 칼슘농도의 증가가 하나의 세포에서 일어나는 지속적인 시간 차에 따른 반응인지 아니면 조직과 세포의 차이에서 오는 특이한 반응인지를 알아보고자 이번 실험에서는 2 시간 후에 다시 칼슘이온의 농도를

측정하였다. 측정결과 대조군과 차이를 보이지 않아 방사선조사 수 분 후와 수 시간 후에 나타나는 칼슘이온의 농도변화는 서로 연관되지는 않으며 세포종류에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

방사선조사 직후 나타나는 일시적인 칼슘이온농도 증가와 방사선조사 수 시간 후 나타나는 칼슘농도의 증가가 어떠한 과정을 통하여 칼슘의존적인 엔도뉴클리아제를 증가시키는지는 아직 정확히 알려져 있지 않으며 이 두 가지 양상의 칼슘이온의 증가가 같은 작용을 할 것인지 서로 반대되는 작용을 할 것인지도 아직 알 수 없는 상태이다. 다만 방사선조사 직후 일어나는 칼슘이온농도의 증가는 방사선에 대한 세포의 민감도와 세포의 성장형태를 변형시키는 작용을 할 것으로 생각되며 수 시간 지속되는 칼슘이온의 증가는 칼슘이온에 의존적인 엔도뉴클리아제의 증가를 일으키고 DNA의 분절을 초래한다고 생각된다. 그러나 이번 실험에서는 칼슘이온이 10 Gy의 방사선조사 직후에만 관찰되었고 수 시간 이후에는 칼슘이온의 증가가 없었으나 KB세포에서는 apoptosis가 발현되었다. 이는 방사선조사 후 apoptosis가 가장 잘 일어나는 세포인 림프구에서 칼슘이온의 항상성이 변화하지 않았다는 보고와 일치한다. 즉 방사선조사 직후 일시적으로 나타나는 칼슘농도 증가도 수 시간 후에까지 지속되는 농도 증가와 같은 역할을 할 것이라는 생각이며 이 결과에서 알 수 있듯이 방사선조사 후 세포내의 일련의 과정들은 즉시 일어나고 DNA 분절도 방사선조사 후 즉시 일어나며 이러한 초기 과정이 차단되면 그 다음 과정은 일어나지 않을 수 있을 것으로 생각된다. 초기에 일어나는 이러한 일련의 과정들을 정지시킴으로 세포의 apoptosis를 막을 수 있겠으며 이러한 일련의 과정 중에 세포막의 변화와 칼슘이온 농도의 증가가 비교적 초기 과정에 일어나므로 칼슘이온억제제나 길항제를 이용하여 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

이번 실험의 결과에서 방사선조사 후 나타나는 apoptosis는 수 시간 내에 일어나고 그 이후

시간의 흐름에 따라 더 이상의 증가는 관찰되지 않았으며 오히려 수 일이 지난 후에는 감소되었는데 이는 apoptosis가 일어난 세포들이 사멸하여 인접 세포나 대식세포의 포식작용이 없으므로 배지로 부유되었을 것으로 생각된다. 따라서 사멸한 세포의 LDH 검사에서 방사선조사 3일 후에 LDH가 증가한 이유는 방사선에 의한 괴사 세포뿐만 아니라 사멸된 apoptotic 세포 때문인 것으로 생각된다.

이 실험을 통하여 KB세포에 10 Gy의 방사선을 조사한 경우 즉시적이며 일시적으로 세포내 칼슘이온의 증가가 나타났고 방사선조사 4 시간 후에 apoptosis가 가장 많이 나타난 것을 알 수 있었다. 그러나 방사선을 조사한 세포 중에 칼슘이온의 농도증가를 보인 세포는 78.9%였으나 4 시간 후 DNA 분절은 11.29%에서 나타났다. 공초점레이저주사현미경은 광학현미경의 기본 틀에 형광장치를 부착하고 레이저광선을 광원으로 이용한 것으로서 레이저선이 한 점으로 모이는 성질을 이용하여 정교한 초점을 쉽게 맺을 수 있고 해상력이 매우 높은 선명한 상을 볼 수 있다. 이러한 특성을 이용하여 분절된 DNA에 형광 염색하여 apoptosis를 확인하는 방법은 apoptotic 세포를 선명히 볼 수 있고 분포를 확인할 수 있는 장점이 있다. 그러나 슬라이드상의 모든 세포의 수를 셀 수 없고 염색 과정에서 건강하지 않은 세포는 슬라이드에서 쉽게 분리될 수 있으므로 유세포분석과 함께 이용하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다.



## 참고문헌

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- 2) Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
- 3) Vaux DL, Haeccker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76: 777-779.
4. Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 245-251.
- 5) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
6. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 1993; 82: 15-21.
7. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK: Prevention of programmed cell death on *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992; 258: 1955-1957.
8. Bertrand R, Kerrigan D, Sarang M, Pommier Y. Cell death induced by topoisomerase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 77-85.
9. Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer* 1991; 64: 192-196.
10. Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs. A cautionary note. *Cancer Res* 1989; 49: 5870-5878.
11. Krishan A, Frei E. Morphological basis for the cytolytic effect of Vinblastine and Vincristine on cultured human leukemic lymphocytes. *Cancer Res* 1975; 35: 497-501.
12. Szende B, Zalutnai A, Schally AV: Programmed cell death (apoptosis) in pancreatic cancers of hamsters after treatment with analogs of both luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 1643-1647.
13. Afanas'ev VN, Korol' BA, Mantsygin YA, Nelipovich PA, Pechtnikov VA, Umansky SR. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS* 1986; 194: 347-350.
14. 박무순, 이삼선, 최순철, 박태원, 유동수. 인체의 암세포주와 치은섬유모세포주에서 방사선조사가 apoptosis 유발에 미치는 영향에 관한 연구. *치과 방사선* 1998; 28: 59-72.
15. Delic J, Magdelenat H, Barbaroux C, Chaillet MP, Dubray B, et al. In vivo induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *Br J Radiol* 1995; 68: 997-1003.
16. Kubota Y, Takahashi S, Sato H. Effect of  $\gamma$ -irradiation on function and viability of alveolar macrophages in mouse and rat. *Int J Radiat Biol* 1994; 65: 335-344.
17. Short A, Bian J, Ghosh T, Waldron R, Rybak S, Gill D. Intracellular  $Ca^{2+}$  pool content is linked to control of cell growth. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 4986-4990.
18. Chae H, Jarvix LJ, Unkun FM. Role of tyrosine phosphorylation in radiation-induced activation of c-jun protooncogene in human lymphohematopoietic precursor cells. *Cancer Res* 1993; 53: 447-451.
19. Hallahan D, Virudachalam S, Schwartz J, Panje N, Mustafi R, Weichelbaum R. Inhibition of protein kinase sensitized human tumor cells to ionizing radiation. *Radiat Res* 1992; 129: 345-350.

20. Hallahan D, Virudachalam S, Sherman M, Kufe D, Weichelbaum R. Tumor necrosis factor gene expression is regulated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer Res* 1991; 51: 4565-4569.
21. Woloschak G, Chanf-Liu CM, Shearin-Jones P. Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res* 1990; 50: 3963-3967.
22. Hallahan D, Virudachalam S, Beckett M, Sherman M, Kufe D, Weichelbaum R. Mechanisms of X-ray-mediated protooncogene c-jun expression in radiation-induced human sarcoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 1677-1681.
23. Blobel G, Sachs C, Khan W, Fabbro D, Stabel S, et al. Selective regulation of expression of protein kinase C (PKC) isozymes in multidrug-resistant MCF-7 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 658-664.
24. Story M, Stephens L, Tomasovic S, Meyn R. A role for calcium in regulating apoptosis in rat thymocytes irradiated in vitro. *Int J Radiat Biol* 1992; 61: 243-251.
25. Bianchini L, Todderud G, Grinstein S. Cytosolic  $[Ca^{2+}]$  homeostasis and tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ -2 in HL60 granulocytes. *J Biol Chem* 1993; 268: 3357-3363.
26. Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Mirabelli F, Finardi G, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free  $Ca^{2+}$  concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res* 1992; 52: 1342-1346.
27. Ramakrishnan N, McClain D, Catravas G. Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1993; 63: 693-701.
28. Duncan D, Lawrence D. Differential lymphocyte growth-modifying effects of oxidants: changes in cytosolic  $Ca^{2+}$ . *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 100: 485-497.
29. Todd DG, Mikkelsen RB. Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free  $[Ca^{2+}]$  in human epithelial tumor cells. *Cancer Res* 1994; 54: 5224-5230.
30. Nikonova LV, Nellipovich PA, Umansky SR. The involvement of nuclear nucleases in rat thymocyte DNA fragmentation after  $\gamma$ -irradiation. *Biochimica Biophysica Acta* 1982; 699: 281-285.
31. Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984; 132: 38-42.
32. Kaminskas E, Li JC. DNA fragmentation in permeabilized cells and nuclei: the role of  $(Ca^{2+}Mg^{2+})$ -dependent endonuclease. *Biochemical J* 1989; 261: 17-21.
33. McConkey DJ, Hartzell P, Duddy SK, Hakansson H, Orrenius S. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin kills immature thymocytes by  $Ca^{2+}$ -mediated endonuclease activation. *Science* 1988; 242: 256-259.
34. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB* 1989; 3: 1843-1849.
35. McConkey DJ, Chow SC, Orrenius S, Jondal M. NK cell-induced cytotoxicity is dependent on a  $Ca^{2+}$  increase in the target. *FASEB* 1990; 4: 2661-2664.
36. Zherbin EA, Chukhlovin AB. Possible association of membrane and nuclear changes in  $\gamma$ -irradiated rat thymocytes. *Int J Radiat Biol* 1984; 45: 179-183.
37. Chandra S, Stefani S. Plasma membrane as a sensitive target in radiation-induced cell injury and death: an ultrastructural study. *Int J Radiat Biol* 1981; 40: 305-311.
38. Sungurov AY, Sharleava TM. Thymocyte membrane changes and modifications of interphase death. *Int J Radiat Biol* 1988; 53: 501-506.

39. Szumiel I, Socanowicz B, Buraczewska I.  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization is related to the lethal effect of x-irradiation in L5174Y cells. *Int J Radiat Biol* 1990; 58: 125-131.
40. Gryniewicz G, Poenir M, Tsien RY. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985. 260: 3440-3450.

Address : Prof. Sam-Sun Lee, Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University, 28-22, Yeongun-dong, Chongno-ku, Seoul, 110-744, KOREA.  
Tel : 02-760-3498 Fax : 02-744-3919  
E-mail : raylee@snu.ac.kr

## 사진부도설명

**Fig. 4.** Control KB cells(X 400). There is no fluorescent cell. The normal cells are counter stained with PI.

**Fig. 5.** Irradiated KB cells(x400, 4 hours after 10 Gy irradiation). There are some fluorescent cells. The cells counterstained with PI to quantitate the incorporation of dNTP.

**Fig. 6.** Irradiated KB cells (x400, 1 day after 10 Gy irradiation). There are some fluorescent cells. Chromatin granules that were present in apoptotic cells. The cells counterstained with PI to quantitate the incorporation of dNTP.

**Fig. 7.** Irradiation KB cells(x400, 3 days after 10 Gy irradiation).There are some fluorescent cells. The cells counterstained with PI to quantitate the incorporation of dNTP.

사진부도

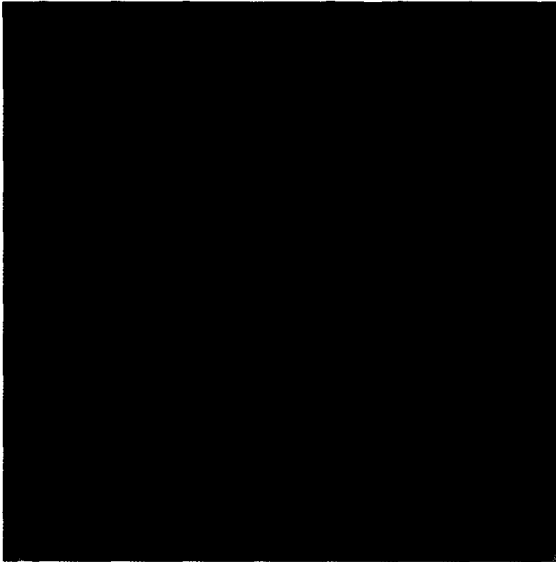


Fig 4

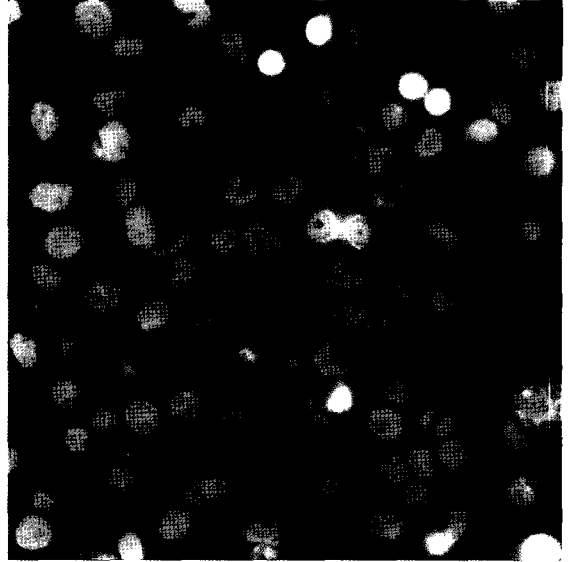


Fig 5



Fig 6

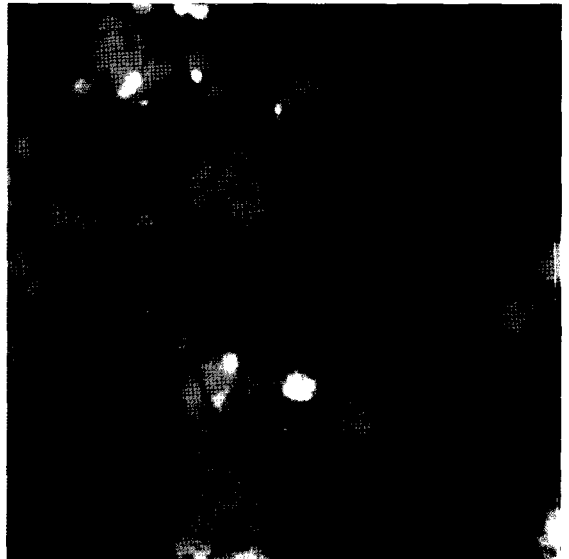


Fig 7