

백서 간에서 방사선조사에 의한 Apoptosis와 Cytokine 발현과의 관계

분당재생병원 진단방사선과*, 이화여자대학교 의과대학 방사선종양학교실†, 진단방사선과학교실‡

안은주* · 이경자† · 이정식†

목 적 : 백서의 간에서 나타나는 방사선조사에 의한 조직손상에서 IL-1, IL-4, IL-6, TNF 등의 cytokine과 apoptosis와의 상관관계를 알아보기 하였다.

대상 및 방법 : 백서의 전신에 8 Gy의 방사선조사 후 각 1일, 3일, 5일, 7일, 14일에 간 조직의 변화를 현미경으로 관찰하고, apoptosis의 발현빈도를 확인하였으며, IL-1, IL-4, IL-6 및 TNF 등의 cytokine에 대해서 면역조직화학염색 방법과, 간 조직과 혈액에서의 IL-6의 생물학적 활성도 측정 및 방사선 면역측정 등의 실험을 하였다.

결 과 : 방사선조사에 의한 간 손상은 광학현미경 소견상 방사선조사 후 1일부터 관찰되어, 3일과 5일에 염증세포의 침윤과 함께 가장 심하게 나타났고, 7일 이후부터는 섬유화가 시작되었다. Apoptosis의 발현빈도는 광학현미경 소견과 *in situ detection method* 모두에서 방사선조사 후 1일에 가장 높게 나타났다. 면역조직화학 염색 소견상, IL-1과 TNF의 발현은 조사 후 1일과 3일에 보였고, IL-4는 모든 군에서 발현되지 않았다. IL-6는 방사선조사 후 1일과 3일에 강양성으로 나타난 후 점차 감소하였고, 간 조직과 혈액에서의 IL-6의 생물학적 활성도와 방사선면역측정에서도 방사선조사 후 1일에 가장 높고 이후 점차 감소하였다.

결 론 : 간에 방사선조사를 시행한 결과 IL-1, IL-6 및 TNF와 같은 cytokine의 발현이 증가되었으며, 이를 cytokine의 분비가 apoptosis를 유도함으로써 apoptosis가 방사선조사에 의한 간 손상에 중요한 기전의 하나로 작용할 것으로 생각된다.

핵심용어 : 방사선조사, 간, Apoptosis, Cytokines

서 론

Apoptosis는 세포손상의 중요한 기전으로 1972년 처음 기술되었고, 종래의 괴사와는 명확하게 구분되는 새로운 개념으로, 배의 발생, 정상 조직에서의 항상성 조절, 암의 발생, 암의 치료 등 인체의 생리적 및 병적 현상 또는 진행에 관여하여 중요한 역할을 한다. 형태학적으로 핵막의 빌어, 염색질의 압축, DNA의 분절화가 이루어지고, 이후 막의 통합성이 상실되는 apoptosis는 막의 통합성이 먼저 없어지고 DNA의 붕괴가 이어지는 괴사와 완전히 구별되며, 다양한 세포에서 자외선, 전리방사선, 이상고열과 같은 자극에 의해 유도되기도 한다.¹⁾ 또한 이런 apoptosis는 방사선에 의한 조직손상에 깊이 관여됨도 여러 연구자들에 의하여 보고되고 있다.^{1, 2)}

이 논문은 2000년 4월 13일 접수하여 2000년 6월 24일 채택되었음.

책임 저자: 안은주, 분당재생병원 진단방사선과

Tel : 031)779-0038 Fax : 031)779-0062

E-mail : joo@dmc.or.kr

감염, 조직 손상, 종양성 성장 및 면역학적 이상 등으로 항상성이 깨진 후 나타나는 급성 반응은 파괴된 항상성을 다시 회복시키려는 개체의 반응으로 이루어진다.³⁾ 급성 반응은 손상된 조직에서 일어나는 국소반응과 그에 의해 유발되는 전신반응으로 나누어지는데, 국소반응에 의해 활성화된 과립백혈구, 단핵세포, 섬유모세포, 그리고 혈관내피세포 등에 의해 cytokine이 분비되어 전신반응을 매개하게 된다. Cytokine은 신체 내의 여러 세포와 조직 사이에서 서로 조절하는 교통 체계로써, 매개분자의 복잡한 망상조직을 형성하여, 생리적인 항상성을 유지하고 회복시킨다. 과거 수 년간, 분자 면역생물학의 발전으로 아직도 이 호르몬과 유사한 단백질이 많이 발견되고 있으며, 이는 고전적인 호르몬과는 별개로, 다른 세포나 조직사이의 상호작용을 매개하는데, 다른 말로는 펩티드 조절인자(peptide regulatory factor)라고 한다. Cytokine의 대부분은 분자질량이 80,000 Da 이하의 당단백질이며, cytokine 합성에 관계하는 세포는 단핵세포, 림프구, 호중구, 혈소판과 같은 혈액 세포와 섬유모세포 같은 간질세포, 내피세포와 평활근 세포, 각질세포, 간세포 같은 상피세포 등이다. 한 cytokine은 여러 자극에 대한 반응으로 다양한 세

포에서 생산될 뿐 아니라, 다양한 표적세포에 대해 여러 가지의 생물학적 효과로 작용한다.⁴⁾ Cytokine의 역할은 수용자의 면역을 증강시키며, 손상된 조직을 복원하고 세포반응과 계통적 항상성을 복구시키는 생물학적 반응을 중재하며, 조절된 cytokine의 반응은 조직복원과 수용자 방어반응에 중요한 요소이기는 하지만, 과량의 cytokine은 조직에 손상과 섬유화를 초래하기도 한다고 한다.⁵⁾ 급성 반응에서 분비되는 cytokine은 주로 인터루킨 1 (interleukin 1, 이하 IL-1로 약함), 인터루킨 6 (interleukin 6, 이하 IL-6로 약함), 종양괴사인자 (tumor necrosis factor, 이하 TNF로 약함) 등이다.³⁾ 일반적으로, TNF, IL-1과 같은 cytokine은 전리방사선, 자외선, 그 외의 다른 자극에 의해 생산되며, 이 cytokine들은 염증세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ TNF는 또한 세포독성 (cytotoxicity)이 있으며, DNA의 분절화를 가지는 programmed cell death 즉, apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ 인터루킨 4(interleukin 4, 이하 IL-4로 약함)는 방사선조사에 의해 그 합성이 감소된다고 하였다.⁷⁾

간은 방사선 치료에 비교적 민감한 장기로, 방사선에 의한 급, 만성 간염의 병리학적 소견은 이미 잘 알려져 왔고, 또한 최근에는 방사선에 의한 손상의 주 기전이 apoptosis로 알려져 있으나, apoptosis에 관여하는 cytokine에 대한 연구는 아직 체계화되어 있지 않은 상태이다.⁸⁾ 따라서 저자들은 백서의 간에 방사선조사를 시행하여 cytokine의 발현과 apoptosis와의 상호관계를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

실험 동물은 체중 250~300 gm의 생후 4~5개월 된 백서 (Sprague-Dawley) 60 마리로 암수 구별 없이 사용하였고, 방사선조사군은 1군부터 5군으로 구분하여 각 군을 10마리로 하였다. 백서를 가볍게 에테르로 흡입 마취한 후 고정틀에 사지를 고정하고, 6 MV 선형가속기(NEC 1006X, Tokyo, Japan)를 사용하여 전신에 8 Gy의 방사선을 분당 2 Gy의 선량률로 단일조사하였다. 방사선조사 후 1일(1군), 3일(2군), 5 일(3군), 7일(4군), 14일(5군)에 희생시켰으며, 대조군은 방사선을 조사하지 않고, 각 군의 희생일에 맞추어 각각 2마리씩 희생시켜 실험하였다. 방사선 면역측정법(radioimmunoassay, RIA)과 생물학적 활성도 측정(bioassay)을 위한 혈액 채취는 심장에서 하였고, 간 조직은 1/2은 활성도 측정을 위해 냉동하였으며, 1/2은 면역조직화학 염색을 위해 10% 포르말린용액에 보관하였다.

10% 포르말린에 고정된 간 조직을 통상의 방법대로 파라-

핀에 포매한 후 절편기를 이용하여 5 μm 절편을 만들어 슬라이드에 붙인 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. Apoptosis의 발현 빈도는 광확대(400배)에서 관찰되는 apoptosis 세포 수를 다섯 번 세어 평균을 구하였고, in situ nick end labelling method는 탈파라핀, 함수를 시킨 후 proteinase K와 반응시키고 Apoptag kit (Oncor, Gaithersburg, USA)를 사용하여 시행하였다. 즉, Tdt (terminal dioxynucleotidyl transferase) 효소와 반응시켜 digoxigenine이 표지된 뉴클레오티드를 결합시킨 후 효소 반응을 중단시키고, anti-digoxigenine-peroxidase를 반응시켜 DAB (3,3-diaminobenzidine)로 발색시켰다. Apoptosis의 발현빈도는 광확대(400배)에서 관찰되는 apoptosis 수를 역시 다섯 번 세어 평균치를 구하였다.

Cytokine의 발현의 측정은 면역조직화학 염색방법과 IL-6의 생물학적 활성도, 방사선면역측정을 함께 하였다. 면역조직화학 염색은 LSAB (Labeled Streptavidin-biotin, DAKO, Carterteria, USA)kit를 사용하여 Hsu 등⁹⁾이 기술한 방법으로 염색하였으며, 일차항체로는 단클론성 IL-1, IL-4항체와 다클론성 IL-6 및 TNF항체를 사용하였다. 파라핀 포매조직으로부터 5 μm의 절편을 만들어 크실랜과 에탄올로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 H₂O₂로 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)를 차단시키고, 인산화 완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2)으로 수세 후 일차항체를 실온에서 IL-4와 IL-6는 30분, TNF는 1시간, IL-1은 10시간 이상 반응시켰다. 일차 항체 반응 후 결합이 안 된 항체를 PBS로 수세하고 바이오틴이 결합된 이차 항체(antirabbit IgG antibody)를 20분간 반응시킨 다음 PBS로 수세한 후 과산화효소가 결합된 streptavidin 용액을 다시 20분간 반응시킨 후 수세하고 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)를 사용하여 발색시켰다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색한 후 증류수로 수세하고 수성 접착제로 포매하여 광학현미경으로 IL-1, IL-4, IL-6 및 TNF의 발현정도를 관찰하여 염색정도를 grade로 분류하였다. 일차 항체 대신 PBS로 반응시킨 군을 음성 대조군으로 하였으며, 대부분의 세포가 가장 강한 양성으로 보이는 경우를 grade 3, 대부분의 세포에서 양성반응을 보이나 염색정도가 약한 경우를 grade 2, 그 사이의 염색상을 보이는 경우 중에 일부의 세포만 양성을 보이는 경우를 grade 1로 분류하였다.

IL-6의 생물학적 활성도 측정은 IL-6 의존성 설치류 교잡체 아콜론(IL-6 dependent murine hybridoma subclone) B 9.55 세포주를 이용하여 IL-6의 활성을 측정하였다. B 9.55세포를 단계적으로 히석한 검체를 10% 우테아혈청을 함유한 완전배지에 심어 37.5°C 배양기에서 72시간 동안 배양하였고, 마지막 배양 6시간 동안 세포들을 0.5 μCi의 3H-thymidine (speci-

fic activity; 84.8 Ci/mmol)으로 표기하였다. 세포는 자동세포 분주기를 이용하여 유리여과기에 모아, 방사성표지된 DNA의 양을 liquid scintillation counter (Beckman, LS 6000A, Brea, USA)로 측정하였다.

IL-6의 방사선면역측정은 다른 cytokine과 교차반응성이 없었으며, 감마 계수기로 측정하였다.

각 방사선조사군의 apoptosis의 수, IL-6의 활성도 측정, 방사선 면역 측정의 결과는 대조군과의 차이를 group t-test를 이용하여 검정, 유의수준 0.05구간에서 통계학적 의의를 분석하였다.

결 과

광학현미경 소견상 간세포 구조가 잘 유지되어 있고, 염증 세포의 침윤이나 섬유화가 전혀 동반되지 않은 대조군의 조직 소견에 비해(Fig. 1A), 방사선조사 후 1일에서의 간 조직은 전반적인 수성 부종과 함께 sinusoidal space가 좁아지면서

Kupffer cell의 이동이 동반되어 있었다(Fig. 1B). Apoptosis는 방사선조사 후 1일에 8.2의 최고치에 도달한 후(Fig. 2A), 조사 후 3일에는 6.4로 줄어들면서 Kupffer cell의 이동을 잘 볼 수 있었다(Fig. 1C, Fig. 2C). 방사선조사 후 7일부터는 apoptosis 수는 정상범위인 2.3개로 관찰되면서, 섬유화가 시작되는 것을 알 수 있었다(Table 1, Fig. 1C).

In situ detection method에 의한 관찰결과, 방사선조사 후 1일(Fig. 2A, B)에 현미경 소견으로 관찰된 8.2개 보다 많은, 14.8개의 apoptosis가 3일부터는(Fig. 2C, D) 9.4로 감소되면서 점차 감소하는 경향을 뚜렷이 보였다. 대조군에 비해 통계적으로 의미있게 증가되어 있는 경우는 1일부터 7일의 결과이고, 14일에는 대조군과 통계적인 차이는 없었다(Table 1)

면역조직화학염색 소견에서 IL-1은 1일과 3일에 양성반응을 보였으나, 이후는 발현되지 않았다(Fig. 3A). IL-4는 모든 군에서 전혀 발현되지 않았다(Fig. 3B). TNF는 IL-1과 유사하게 1일과 3일에 양성반응을 보인 후 감소하였다(Fig. 3C, D). IL-6는 1일과 3일에 전반적으로 염색되는 강양성을 보였고,

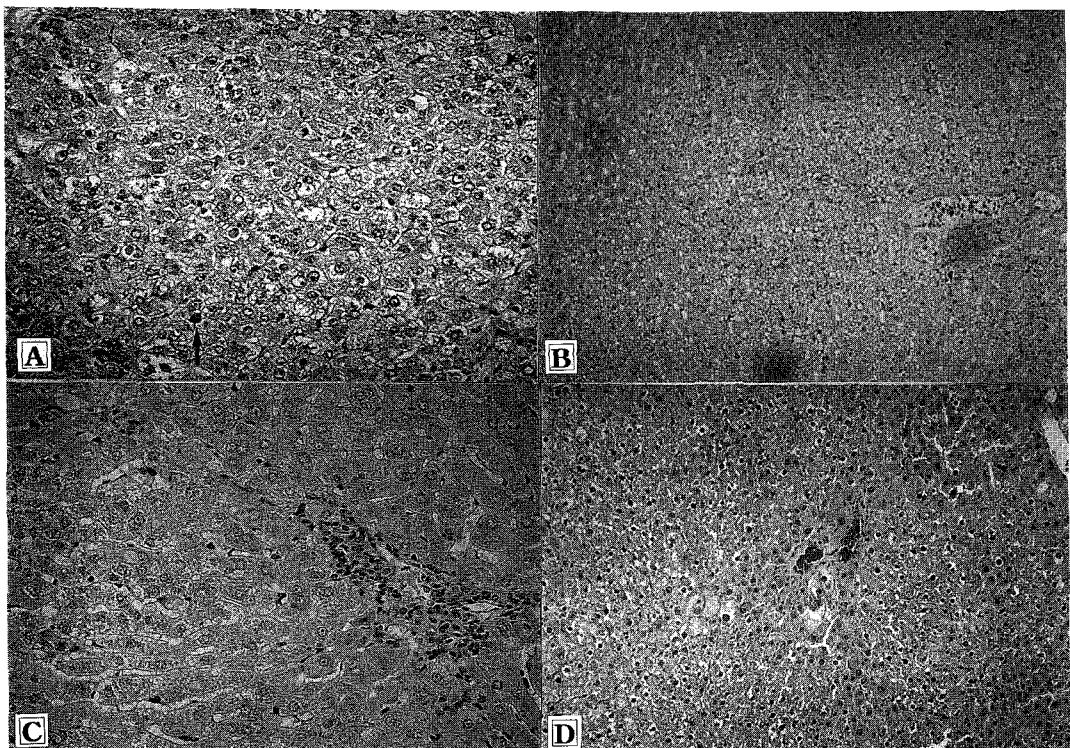


Fig. 1. Histopathologic findings in control and irradiated liver tissue.

- A) Hepatic lobular architecture is well preserved in normal control tissue(H&E stain, $\times 100$).
- B) Hydroptic swelling of hepatocytes and increased apoptotic bodies(arrow) are observed in postirradiation 1 day(H&E stain, $\times 200$).
- C) Postirradiation 3 days revealed mild infiltration of inflammatory cells & Kupffer cell mobilization (H&E stain, $\times 200$).
- D) Mild fibrotic change is shown in postirradiation 7 days(H&E stain, $\times 100$).

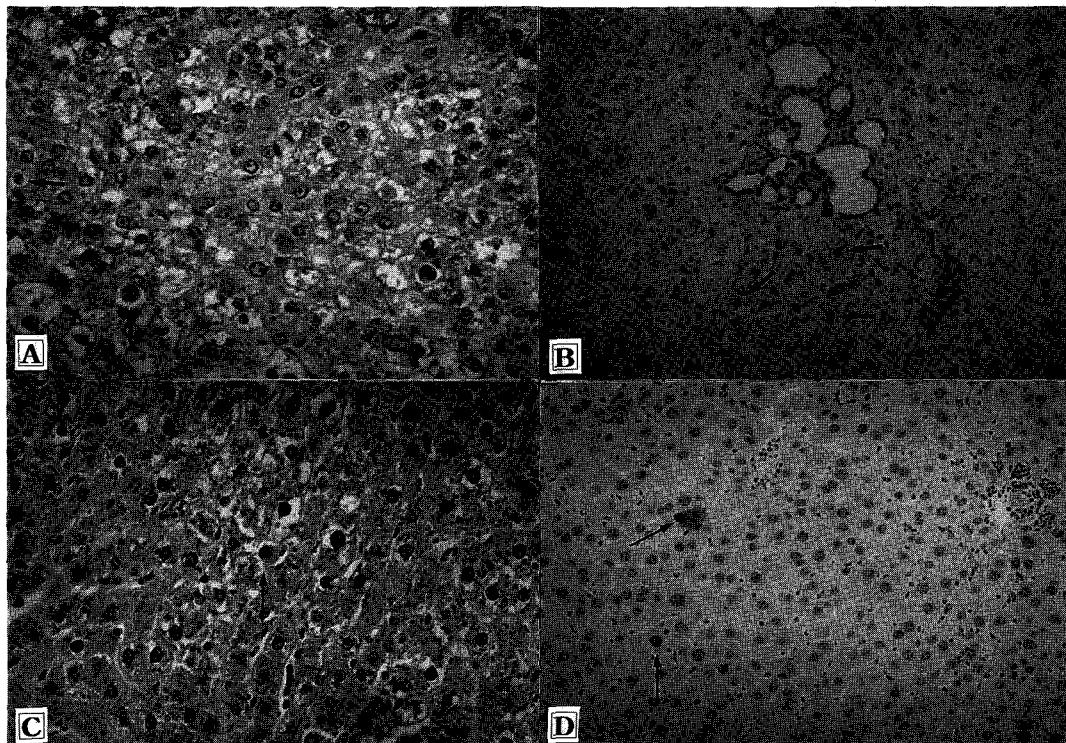


Fig. 2. Apoptotic bodies(arrows) are frequently seen in postirradiation 1 and 3 days.
 A) Apoptotic bodies in light microscopic findings in postirradiation 1 day (H&E stain, $\times 200$).
 B) Apoptotic bodies detection with In situ Nick end labelling method in postirradiation 1 day (In situ detection, $\times 200$).
 C) Apoptotic bodies in light microscopic finding in postirradiation 3 days (H&E stain, $\times 200$).
 D) Apoptotic bodies in In situ detection in postirradiation 3 days ($\times 200$).

Table 1. Number of Apoptotic Cells Induced by 8 Gy x-irradiation

method	control	post-irradiation day				
		1 day	3 days	5 days	7 days	14 days
Light microscope	1.5 \pm 0.7	8.2 \pm 2.7*	6.4 \pm 1.8*	3.5 \pm 1.9*	2.3 \pm 1.4*	2.4 \pm 1.3
In situ detection	1.4 \pm 0.7	14.8 \pm 5.3*	9.4 \pm 3.0*	6.7 \pm 2.9*	3.6 \pm 2.0*	2.4 \pm 1.3

* $p<0.05$, No. of apoptosis : mean \pm S.D.

이후 점차 감소하였다(Table 2, Fig. 4).

간 조직에서 IL-6의 생물학적 활성도는 대조군에 비해 1일에 통계학적으로 의미있게 증가되어 있었고, 그 이후는 점차 감소되어 14일에는 통계학적으로 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 그러나 모든 방사선조사군이 대조군에 비해서는 활성도가 증가되어 있었고, 1일부터 14일에 이르기까지 점차 감소하는 경향을 뚜렷이 보여주었다(Table 3).

혈액에서의 IL-6 활성도 결과는 모든 군에서 대조군보다

Table 2. Immunohistochemical Stain of Cytokines

control	post-irradiation day				
	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days
IL-1	-	+	+	-	-
IL-4	-	-	-	-	-
IL-6	-	+++	+++	++	+
TNF	-	++	+	-	-

+ : Focal stain, ++ : Diffuse weakly stain, +++ : Diffuse strongly stain

통계학적인 의미있는 증가는 보이지 않았지만, 1일에 가장 높고, 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Table 3).

방사선면역측정 결과 역시 간 조직과 혈액에서의 IL-6는 1일에 가장 높은 수치를 보이고, 14일에 이르기까지 점차 감소하였으며, 이는 모두 대조군보다 증가된 수치였다(Table 4).

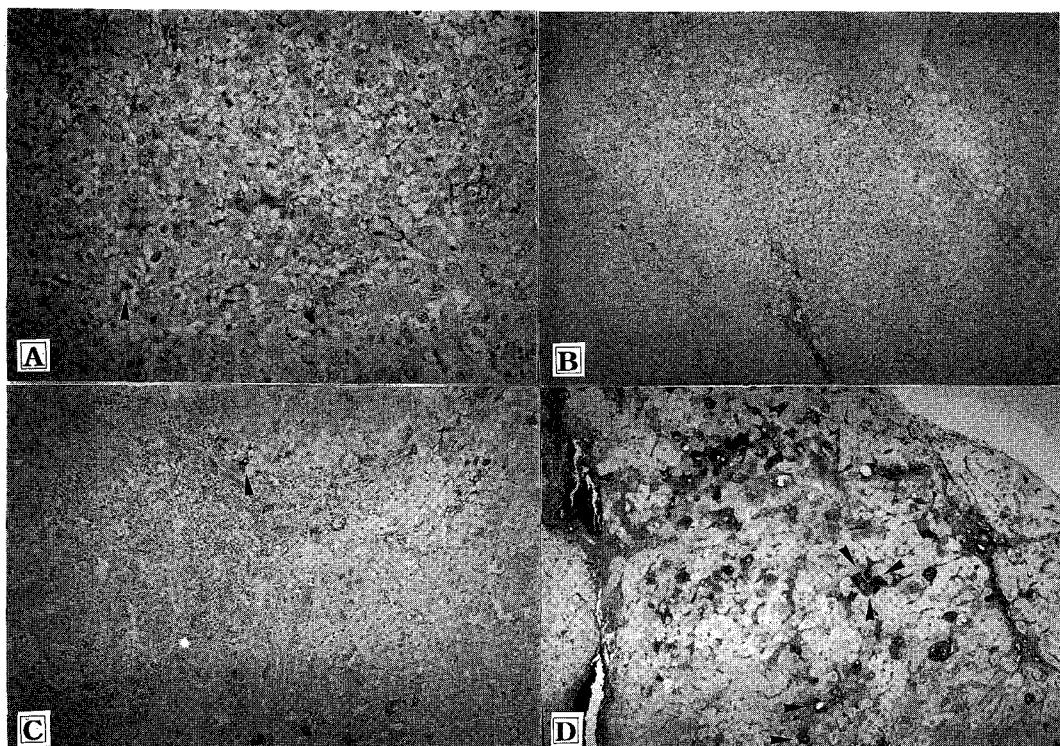


Fig. 3. Immunohistochemical stain of IL-1, IL-4, and TNF in the rat's liver.
A) IL-1 is weakly expressed (arrowhead) in postirradiation 1 day (Immunostain, $\times 200$).
B) IL-4 is not detected (Immunostain, $\times 200$).
C) TNF expression is highest in postirradiation 1 day (Immunostain, $\times 100$).
D) TNF expression is decreased in postirradiation 3 days (Immunostain, $\times 100$).

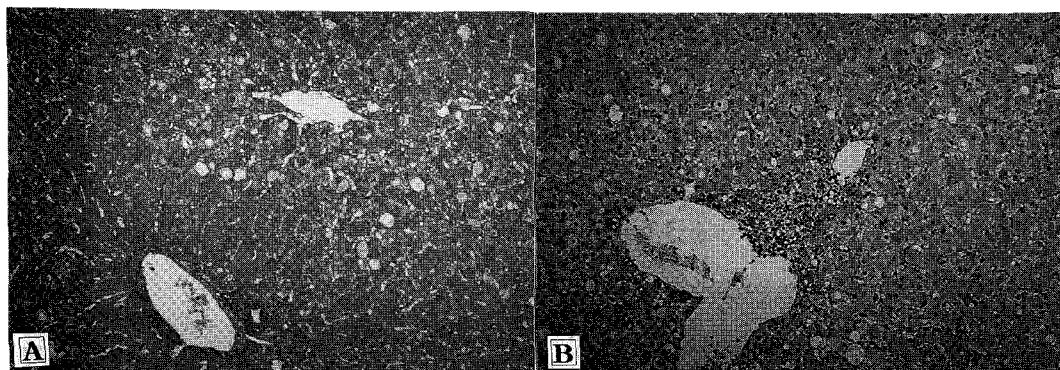


Fig. 4. Immunohistochemical stain of IL-6 in the rat's liver.
A) Strong and diffuse expression of IL-6 is demonstrated in postirradiation 1 and 3 day (Immunostain, $\times 100$).
B) IL-6 expression is markedly decreased in postirradiation 5 days (Immunostain, $\times 100$).

고안 및 결론

방사선 조사에 의한 세포사의 주 기전은 생식세포사와 apoptosis이며, apoptosis는 괴사와는 명확히 구분되는 개념이

다.¹⁰⁾ 형태학적으로 염색질의 압축, 세포 수축, 세포소기관의 유지, 주위 세포에서의 박리, 핵과 세포질의 빨아와 주위세포의 식작용 등으로 구성되는 일련의 과정으로 이루어지는 apoptosis는, DNA의 분해가 세포막 통합성의 상실보다 선행하는 것으로 괴사와는 구분되며, 정상적인 생리학적 조건 또

Table 3. Result of IL-6 by Bioassay in Liver and Blood

control	post-irradiation day					
	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days	
Liver	18,780* ±5,400	43,342* ±14,471	35,701* ±9,726	29,850* ±7,041	26,899* ±3,996	24,949 ±3,497
Blood	2,213 ±654	6,106 ±4180	4,476 ±749	3,019 ±703	2,985 ±568	2,500 ±298

*p<0.05, IL-6 unit : mean±S.D. (u/ml)

Table 4. Levels of IL-6 by RIA in Liver and Blood

control	post-irradiation day					
	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days	
Liver	263 ±54	1,286 ±842	675 ±207	670 ±395	535 ±134	398 ±163
Blood	142 ±28	441 ±197	308* ±28	228 ±9	231 ±129	208 ±36

*p<0.05, IL-6 unit : mean±S.D. (u/ml)

는 병리학적인 상태 모두에서 관찰할 수 있다.¹¹⁾ 방사선조사에 의한 apoptosis는 1982년 소장에서 처음 보고된 이래, 이후 많은 연구에서 여러 세포주, 종양세포에서의 apoptosis가 관찰되었으며, 또한 방사선조사에 의해 apoptosis가 유도되며, apoptosis가 방사선조사에 의한 세포사의 가장 주된 기전으로 알려져 왔다.^{12, 13)} 방사선조사에 의해 유도되는 apoptosis는 그 발현이 빠른 것으로 밝혀졌는데, Meyn 등²⁾과 Stephens 등¹⁴⁾의 연구에 의하면, 임파계 세포에서 2~6 Gy의 소량의 방사선조사에도 apoptosis가 6시간 내에 시작되었다고 하였고, 백서 소뇌의 연구에서도 방사선조사 후 9시간에 apoptosis가 관찰되었다고 하였다.¹⁵⁾ 간에서 방사선조사에 의한 apoptosis는 1995년 Terashima 등⁸⁾에 의하여 처음 기술되었으며, 전신에 7 Gy의 방사선조사 후 30분에 DNA 분절화를 볼 수 있었고, 이는 조사 후 1~6시간에 정점에 도달하였다고 하였다. 본 연구에서 apoptosis가 방사선조사 후 1일에 가장 많이 관찰된 것과 일치하는 소견이다. 물론 조사 후 시간별로 회생시켜 보지는 못했지만 6시간에 나타나는 병리조직학적 소견은 날짜로는 1일에서 많이 나타나는 것으로 생각할 수 있으므로, 방사선조사 후 apoptosis가 일어나는 것은 급성 반응으로 생각된다. 또한 apoptosis는 간세포 뿐 아니라, 담관상피세포에서도 관찰되었다. 이는 광학현미경으로는 관찰되지 않았지만, 예민한 검사법인 *in situ detection*에서는 알 수 있었다.

IL-1은 다양한 면역, 대사, 생리, 조혈, 그리고 면역기능에 관여하는 폴리펩티드로, 감염, 미생물 독소, 염증반응성 물질 등 다양한 자극에 의해 여러 가지 세포에서 IL-1의 생산이

증가되며, 조직에서 IL-1의 생산은 섬유화, 면역반응의 변화와 같은 작용을 하게 된다.¹⁶⁾ 방사선조사는 여러 세포에서 IL-1의 생산을 증가시키는 것으로 알려져 있는데, 폐에서 IL-1을 포함한 cytokine의 분비가 방사선조사 후의 염증반응과 섬유화의 원인이며, 이는 2 Gy의 방사선조사 후 18시간 이내에 일어났다고 하였고, 비장에서도 20 Gy의 방사선조사 후 IL-1의 증가를 보고하였는데, 이 때 IL-1은 방사선 반응의 발생과 진행을 조절하는 역할을 한다고 하였다.^{16~20)} 본 연구에서도 방사선조사 후 1일과 3일에 IL-1이 증가되어 다른 연구결과들과 같이, IL-1이 방사선조사 후 빠른 시기에 증가되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 1일부터 분비되는 IL-1이 방사선조사에 의한 조직 손상에 관여한다고 생각되었고, 이는 섬유화 뿐 아니라 apoptosis에도 관여한다고 생각된다.

IL-4는 활성화된 T세포에서 주로 생산되며, 원래 B세포의 증식과 성숙에 관여한다고 알려져 왔으나, 최근에는 여러 가지 세포 즉, T세포, 조혈세포, 혈관내피세포, 상피세포 등에 대해 다양한 작용을 하는 것으로 되어 있고, IL-4가 염증반응에서 보체의 활성화에 관여한다는 주장도 있다.^{21, 22)} IL-4는 programmed cell death 즉, apoptosis를 유도하는 것으로, 인체의 B 세포 전구체에 세포독성이 있는 것으로 알려져 있으나, 방사선조사와 관련된 IL-4의 연구결과들은 방사선조사가 IL-4의 합성을 감소시킨다고 보고되어 있다.^{7, 23)} 본 연구 결과에서도 모든 군에서 IL-4가 발현되지 않아 방사선조사는 IL-4의 분비를 감소시키거나 최소한 영향이 없는 것으로 생각된다.

IL-6는 다기능을 갖는 cytokine의 하나로 B세포의 분화인자로 B세포의 항체 생산을 증가시켜 면역반응에 중요한 역할을 하여 IL-6의 과다생산은 다클론성 B세포의 활성화를 유발시켜 항체를 생산하게 한다. 그리고 IL-6는 조혈기능과 급성기 반응에도 중요한 역할을 한다.⁹⁾ 급성기 반응이란 한 개체에서 감염, 조직 손상, 종양, 면역이상 등으로 체내의 균형이 깨졌을 때 이를 바로 잡기 위해 즉각적으로 일어나는 일련의 반응으로, 손상이 일어난 장소에서 활성화된 백혈구, 섬유모세포, 혈관내피세포들이 cytokine, 특히 IL-6, IL-1, TNF를 분비함으로써 일어나는데 이들은 체내에 퍼져 있는 표적 세포의 특이 수용체에 작용하여 열, 백혈구 증다증, 적혈구 침강 속도의 증가, 부신피질 자극호르몬과 당질 코르티코이드의 분비증가, 보체 및 혈전 형성경로의 활성화, 혈중 철과 아연의 감소, 음성 질소균형, 간에서 급성 단백질의 합성 등의 전신반응을 일으킨다.³⁾ Cytokine 중에서도 IL-1, IL-6, TNF가 급성기 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

IL-6는 방사선조사 후에 증가되고, 방사선조사는 Y6 세포

계에서 대식세포를 IL-6로 분화되도록 유도하며, 또한 IL-6는 성장방해와 apoptosis를 유도하기도 하며, Neta 등²⁴⁾은 IL-6가 IL-1, TNF와 상호 작용하여 ACTH를 유도하여 방사선조사에 의한 치사율에 방어작용을 한다고 하였다.²⁵⁾ 본 연구 결과에서도 면역조직화학염색, 생물학적 분석(bioassay), 방사선면역 측정법(RIA) 결과 모두에서 방사선조사 후 1일과 3일에 IL-6가 조직과 혈청에서 모두 증가된 결과를 보여주었다. 이 증거는 5일, 7일로 갈수록 점차 감소하였으며, 모든 방사선 조사군이 대조군보다는 높게 나타났다. 따라서 간 조직에서 방사선조사 후 발생하는 apoptosis는 IL-6와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 특히 IL-6가 면역조직화학염색 뿐 아니라 방사선면역측정에서 확인되었고 또한 생물학적 활성도 측정에서 활성도가 증가한 것은 IL-6의 발현 뿐 아니라, 활성이 증가한 것으로 나타나 방사선조사시 IL-6가 어떤 역할을 하리라는 것이 확실하다고 생각된다. 시기적으로도 IL-6 발현 정도가 apoptosis 발현빈도와 일치함으로써 상관관계가 있음을 추측할 수 있었다.

TNF는 17kD의 폴리펩티드로 처음에는 cachectin으로 불리우며, 심한 염증이나 종양 등에서 패혈성 속과 악액질을 유발하며 그 외에도 다양한 기능을 가진다고 하였다.²¹⁾ TNF와 IL-6는 IL-1과 함께 급성기 반응을 유발하며, 또한 섭유모세포, 혈관내피세포, 상피세포 등에 작용하여 IL-6를 합성하도록 한다.²⁶⁾ 방사선조사 후 여러 세포에서 TNF의 증가는 여러 연구에서 보고되었고, 또 그 기전은 TNF와 방사선조사 모두 sphingomyelin을 ceramide로 가수분해를 활성화시킴으로 apoptosis를 유도한다고 하였다.^{27~30)} Krivenko 등³¹⁾은 9 Gy의 방사선조사에서 24시간에 7배, 48시간에 2.3배 TNF양이 증가된다고 하여, TNF도 다른 cytokine과 마찬가지로 방사선조사 후 빠른 시간에 증가되어 이 증가된 TNF가 방사선 손상과 관계되는 병리기전에 관여할 것으로 보고하였다.³¹⁾ 본 연구에서 TNF는 1일과 3일에 많이 발현되고, 이후 감소하는 결과로 나타나, TNF도 다른 cytokine과 마찬가지로, 방사선조사 후 빨리 증가되며, 이는 또한 방사선조사에 의한 조직의 손상에 밀접한 관련이 있다고 할 수 있겠다.

결론적으로 방사선조사 후 1일과 3일에 IL-1, IL-6 및 TNF가 증가되는 것은 방사선에 의한 세포와 조직의 손상 즉, apoptosis와 연관되어 있으며, cytokine에 의해 apoptosis가 유도된다는 기존의 연구 결과에 따르면, 이들 cytokine이 apoptosis를 유발하는 것으로 생각할 수 있다. Kuida 등³²⁾은 Interleukin-1 β converting enzyme (ICE)이 없을 경우에 IL-6와 TNF의 양이 감소하였고, ICE가 있는 경우는 Fas Ab에 의한 apoptosis가 관찰되나, ICE가 없을 경우에는 apoptosis가 발생

되지 않기 때문에, IL-1이 IL-6와 TNF를 유도하고, 이것이 apoptosis를 발생시킬 것이라고 하였다.³²⁾ 따라서 방사선조사에 의한 조직 손상은 급성 반응의 일부로 IL-1, IL-6, TNF 등의 cytokine을 분비하여 이것이 apoptosis를 유도함으로써 발생한다고 생각할 수 있다. 그러나 본 연구 결과로는 백서 간에서 apoptosis와 cytokine의 발현의 시기가 일치하는 것만을 확인함으로써 apoptosis와 cytokine의 상호 연관성을 입증하였지만, 양자간의 인과관계를 규명하기 위한 연구가 필요하다. 앞으로의 연구는 방사선조사 후 1일 이내의 시간대별 cytokine의 발현과 apoptosis를 확인하거나, cytokine 혹은 그 항체를 전처치하는 등의 방법을 이용하여 cytokine에 의한 apoptosis의 유발을 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ling CC, Guo M, Chen CH, Deloherey T. Radiation-induced apoptosis: Effects of cell age and dose fractionation. *Cancer Res* 1995;55:5207-5212
2. Meyn RE, Stephens LC, Ang KK, et al. Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies. *Int J Rad Biol* 1993;64:583-591
3. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-636
4. Andus T, Bauer J, Gerok W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 1991;13:364-375
5. Van Snick J. Interleukin-6: An overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253-278
6. Janssen YMW, Houten BV, Borm PJA, Mossman BT. Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993;69(3):261-274
7. DeKruyff RH, Fang Y, Urmetsu DT. IL-4 based helper activity of CD4+ T cells is radiation sensitive. *Cellular Immunology* 1995;160(2):248-256
8. Terashima M, Ogawa Y, Hamada N, et al. Development of apoptosis by whole-body irradiation in murine liver. *Nippon Acta Radiologica* 1995;55(9):700-702
9. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody(PAP) procedure. *J Histochim Cytochem* 1981;29:577-581
10. Langley RE, Quartuccio SG, Kennealey PT, Coleman CN, Bump EA. Effect of cell cycle stage, dose rate and repair of sublethal damage on radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Radiat Res* 1995;144(1):90-96
11. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-1254
12. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol*

- Physics 1995;33(4):781-796
13. Lichter AS, Lawrence TS. Recent advances in radiation oncology. *New Eng J of Med* 1995;332(6):371-379
 14. Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, Milas L, Meyn RE. Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiat Res* 1993;135:75-80
 15. Fritsche P, Naour R, Denis S, Menetrier F. Kinetics of radiation-induced apoptosis in the cerebellum of 14-day-old rats after acute or during continuous exposure. *Int J Radiat Biol* 1994;66(1):111-117
 16. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77(8):1627-1652
 17. Woloschak GE, Chang-Liu CM, Jones PS, Jones CA. Modulation of gene expression in syrian hamster embryo cells following ionizing radiation. *Cancer Res* 1990;50:339-344
 18. Ansel JC, Luger TA, Green I. Fever and increased serum IL-1 activity as a systemic manifestation of acute phototoxicity in New Zealand white rabbits. *J Invest Dermatol* 1987;89:32
 19. O'Brien-Ladner A, Nelson ME, Kimler BF, Wesselius LJ. Release of interleukin-1 by human alveolar macrophages after in vitro irradiation. *Radiat Res* 1993;136(1):37-41
 20. Ishihara H, Tsuneoka K, Dimchev AB, Shikata M. Induction of the expression of the interleukin-1 β gene in mouse spleen by ionizing radiation. *Radiat Res* 1993;133(3):321-326
 21. Cho MS, Cho SY, Kim MJ, Kim SS, Seo JW, Han WS. Immunohistochemical study of IL-4, IL-6, and TNF expression in cardiac myxoma. *Korean J. Pathol* 1995;29:563-571
 22. Karlyle K, Christian-Ritter HLD, Hoie EB, Zach TL. Effect of interleukin-4 on the synthesis of the third component of complement by pulmonary epithelial cells. *Am J Pathol* 1984;144:171-176
 23. Manabe A, Coustan-Smith E, Kumagai M, et al. Interleukin-4 induces programmed cell death(apoptosis) in cases of high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994;83(7):1731-1737
 24. Neta R, Perlstein R, Vogel SN, Ledney GD, Abrams J. Role of interleukin 6 in protection from lethal irradiation and in endocrine responses to IL-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1992;175(3):689-694
 25. Oritani K, Kaisho T, Nakajima K, Hirano T. Retinoic acid inhibits interleukin-6-induced macrophage differentiation and apoptosis in a murine hematopoietic cell line, Y6. *Blood* 1992;80(9):2298-2305
 26. Van Damme J, Opdenakker G, Simpson R, et al. Identification of the human 26-kD protein, interleukin 2 as a B cell hybridoma/ plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1987;165:914-919
 27. Iwamoto KS, McBride WH. Production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid and tumor necrosis factor-alpha by murine peritoneal macrophages in response to irradiation. *Radiat Res* 1994;139(1):103-108
 28. Hong JH, Chiang CS, Campbell IL, Sun JR, Withers HR, McBride WH. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Physics* 1995;33(3):619-626
 29. Chen M, Quintans J, Fuks Z, Thompson C, Kufe DW, Weichselbaum RR. Suppression of Bcl-2 messenger RNA production may mediate apoptosis after ionizing radiation, tumor necrosis factor alpha, and ceramide. *Cancer Res* 1995;55(5):991-994
 30. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, et al. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994;180:525-535
 31. Krivenko SI, Dryk SI, Komarovskaya ME, Karkanitsa LV. Ionizing radiation increases TNF/cachectin production by human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Int J Hematol* 1992;55:127-130
 32. Kuida K, Lippke JA, Ku G, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 1995;267:20

Abstract

The Relationship between Radiation-Induced Apoptosis and the Expression of Cytokines in the Rat's Liver

Eun Joo An, M.D.*[†], Kyung-Ja Lee, M.D.[†] and Chung-Sik Rhee, M.D.[†]

*Department of Diagnostic Radiology, Pundang Jesaeng General Hospital,

[†]Department of Radiation Oncology and [†]Diagnostic Radiology, College of Medicine,
Ewha Womans University, Seoul, Korea

Purpose : To determine the role of cytokines in the apoptosis of rat's liver following irradiation.

Materials and Methods : Sprague-Dawley rats were irradiated to entire body with a single dose of 8 Gy. The rats were divided into 5 groups according to the sacrifice day after irradiation. The liver and blood after 1, 3, 5, 7, and 14 days irradiation were sampled for evaluation of mechanism of apoptosis and role of cytokine in relation to radiation-induced tissue damage. The study was composed of microscopic evaluation of liver tissue, in situ detection method for apoptosis, immunohistochemical stain of IL-1, IL-4, IL-6 and TNF, bioassay and radioimmunoassay of IL-6 in liver tissue and blood.

Results : Radiation-induced liver damage was noted from first day of radiation, and most severe parenchymal damage associated with infiltration of chronic inflammatory cells was seen in the groups of 5 days after radiation. A number of apoptosis were observed 1 day after radiation on both light microscope and in situ method. Afterwards, the number of apoptosis was gradually diminished. On immunohistochemical study, IL-1 and TNF were expressed 1, 3 days after radiation, but not expressed after that. IL-4 was not expressed in the entire groups. IL-6 was expressed with strong positivity in 1, 3 days after radiation. Bioassay and RIA of IL-6 in liver tissue and blood showed the highest value in 1 day after radiation, and the value is diminished after then.

Conclusion : Apoptosis seemed to be the important mechanism of radiation-induced liver damage, and is possibly induced by the release of cytokines, such as IL-1, IL-6, TNF in view the simultaneously increased appearance of apoptosis and cytokines.

Key Words : Radiation, Liver, Apoptosis, Cytokine