

# 양성자빔 조사에 따른 MRC-5와 SK-N-SH의 DNA 손상 후 회복 특성 — DNA Repair Characteristics of MRC-5 and SK-N-SH Irradiated with Proton Beam —

대구가톨릭대학교 방사선학과 · 건국대학교 의학공학부<sup>1)</sup>

최은애 · 이봉수<sup>1)</sup> · 조영호

## — 국문초록 —

양성자 빔의 조사선량에 따라 정상섬유모세포인 MRC-5와 신경모세포종세포인 SK-N-SH의 DNA 손상도를 확인하고 시간 흐름에 따른 회복률을 비교 분석하였다.

두 가지의 세포에 2Gy, 5Gy, 8Gy의 양성자 빔을 각각 조사한 후 Alkaline comet assay를 실시하였다. Tail moment를 측정하여 DNA의 손상도를 비교하였고 일정시간이 지난 후 재 측정을 하여 두 가지 세포의 회복가능성을 비교하였다.

세가지 선량으로 양성자 빔을 조사하였을 때 전체적으로 SK-N-SH에 비해 MRC-5의 DNA 손상도는 낮았지만 8Gy 조사하였을 때 MRC-5의 Tail moment값은 50,3202±23,17155로 위험수준의 손상이 발생함을 알 수 있었다. 또한 2Gy와 5Gy 조사하였을 때 두 세포 모두 25시간 안에 거의 회복되는 반면 8Gy 조사시 두 세포 모두 회복률이 낮아졌으며 MRC-5의 경우 25시간 후 측정시 Tail moment값은 18,1536±4,42849로 선량 증가에 크게 반응하여 회복률이 낮아짐을 확인하였다.

양성자 빔의 SOBP 중 다른 지점에 비해 distal declining edge에서 LET가 더 높으며 선량을 높이면 그 차이는 월등히 커진다. 이러한 특징과 더불어 본 연구에서 확인한 고선량 조사시 정상섬유모세포의 회복률이 낮아져 지속적인 손상으로 이어진다는 점은 양성자 치료시 주의하여야 한다. 종양조직에 해당하는 SOBP 중 심부에 조사되는 조건 뿐 아니라 더 높은 RBE의 주변 정상조직에 적용되는 조사조건을 확인하여야 부작용을 막을 수 있다.

**중심 단어:** 양성자치료, DNA, alkaline comet assay, MRC-5, SK-N-SH

## I. 서 론

양성자선은 브래그 피크(Bragg peak)라는 물리적 특성에 의해 정지하기 직전에 약 80%의 에너지를 발산한다<sup>1-5)</sup>.

\*접수일(2011년 10월 17일), 심사일(2011년 11월 10일), 확정일(2011년 12월 6일)

- 이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(20110028022).

교신저자: 조영호, (712-702) 경상북도 경산시 하양읍 하양로 13-13  
대구가톨릭대학교 방사선학과  
TEL: 053-850-3439, FAX: 053-850-3292  
E-mail: yhcho14@cu.ac.kr

이를 양성자 치료에 적용시 브래그 피크의 폭을 넓히기 위해 SOBP(Spread Out Bragg Peak)를 만들어 특정 부피를 가진 종양에 균일조사 한다<sup>6-8)</sup>. 깊은 곳까지 지속되는 고선량의 SOBP 부분이 입사지점 보다 상대 생물학적 효과비(Relative Biological Effectiveness; RBE)가 높다는 이론적 바탕으로 정상조직의 피해는 최소화 시켜주되 종양조직 전체에는 최대의 손상을 주게 된다<sup>9)</sup>.

그러나 균일하게 지속되다가 멈추어야 할 SOBP 영역의 빔은 진행될수록 선에너지부여(Linear Energy Transfer; LET)가 높아지고 이에 따라 RBE값이 달라진

다<sup>10)</sup>. SOBP 영역의 마지막 지점은 선량은 급히 감소되는 반면 높은 LET에 의해 RBE값은 SOBP 중간부분에 비해 월등히 높다. 이러한 특징은 양성자 치료시 종양조직 주변의 가까운 정상조직이 큰 손상을 받으며 회복에 실패하여 부작용이 발생할 수 있음을 말한다. 그 가능성은 정확한 선량 포커싱이 힘든 가장자리가 균일하지 않은 모양의 종양조직 또는 복잡한 신경계에서 발생할 수 있으며 방사선 감수성이 높은 환경인 소아환자 치료시에 나타날 경우 그 피해는 더 크다.

이러한 양성자선의 특징으로 인해 SOBP의 세포 생존율(Surviving Fraction; SF)은 시작지점보다 마지막 지점에서 월등히 낮다<sup>11)</sup>. 이는 양성자빔의 LET가 증가함에 따라 세포의 손상도 역시 증가함을 뜻하며 DNA의 염기 손상이나 탈락보다 세포 사멸에 직접 관여하기 쉬운 SSB(Single Strand Breaks)나 DSB(Double Strand Breaks)의 비율이 더 높아지는 것을 의미한다<sup>12)</sup>. 특히 DNA의 DSB가 일어날 경우 회복되는 확률은 대단히 낮아 SOBP 영역의 종양조직이 아닌 정상조직에게는 치명적인 손상이 될 가능성이 높다.

따라서 본 연구는 양성자 빔에 의한 정상섬유모세포와 신경모세포종 세포의 DNA 손상도를 Alkaline comet assay를 통해 알아보고자 하였다. 또한 일정시간이 지난 후 재 측정을 통해 두 가지 세포주의 회복가능성을 비교함으로써 정상조직의 피해여부를 평가하였으며 선량의 변화에 따른 회복률을 보고자 하였다.

## II. 대상 및 방법

### 1. 세포배양

한국 세포주 은행에서 MRC-5(human, normal fibroblast)와 SK-N-SH(human, neuroblastoma)를 분양받았다. 세포가 담긴 냉동상태의 e-tube를 37°C의 water bath에서 신속히 녹인 후 Minimum Essential

Medium 90%(GIBCO, USA)와 활성화 시킨 fetal bovine serum 9%(GIBCO, USA)와 penicillin streptomycin 1%(GIBCO, USA)의 배양액이 담긴 원심관에 옮겨 담아 1000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상등액은 버리고 배양액 첨가 후 T25 cm<sup>2</sup> 플라스크에 배양을 하였다. 양성자 조사 48시간 전 trypan blue(SIGMA, USA)로 염색을 한 뒤 hemocytometer를 사용하여 세포의 개수를 측정하여 1×10<sup>6</sup>개를 T25 cm<sup>2</sup> 플라스크에 분주하였다. 배양은 37°C의 5% CO<sub>2</sub>환경의 incubator에서 이루어졌다. 양성자선 조사 시설로 이동할 때 세포의 손상을 막기 위해 T25cm<sup>2</sup> 플라스크에 배양액을 가득 채우고 입구는 파라필름으로 감은 뒤 보온박스에 담아 이동하였다.

### 2. 양성자선 조사

서울 원자력 의학원의 MC-50 cyclotron(Scanditronix, Sweden)을 이용한 45MeV 저선량 양성자빔 시험이용시설로 방사선을 조사하였다. 총선량은 3가지이며 나머지 조건은 모두 동일하였다(Table 1).

### 3. Alkaline comet assay

Singh 등의 방법에 준하여 시행하였으며<sup>13)</sup> 전 과정은 추가적인 DNA 손상을 방지하기 위하여 암실에서 진행되었다.

#### 1) 세포용해 및 슬라이드 준비

양성자빔을 조사한 세포 1×10<sup>5</sup>개를 1XPBS 1 ml(GIBCO, USA)에 현탁시켰다. 그리고 e-tube에 아가로즈겔 500 μl (TREVIGEN, USA)와 세포현탁액 50 μl를 섞었다. 슬라이드 위에 75 μl씩 고르게 퍼뜨린 후 4°C로 30분간 두었다. 그 후 슬라이드를 lysis solution(TREVIGEN, USA)에 담근 후 4°C에 40분간 두었다. 실온의 alkaline unwinding solution(TREVIGEN, USA)에 담가 40분간 두었다.

Table 1. Condition of proton irradiation used in this study

Absorbed dose	Dose rate	LET <sup>a</sup>	Beam Energy <sup>b</sup>	Beam current	SSD <sup>c</sup>	Dose uniformity
2 Gy						
5 Gy	0.194 Gy/sec	3.76 KeV/μm	13.16 MeV	5 nA	300 cm	5 cm×5 cm > 90%
8 Gy						

<sup>a</sup>At the 13.16 MeV

<sup>b</sup>Beam energy down using aluminum degrader 4.1 mm

<sup>c</sup>The distance between beam window and cells

2) 전기영동 및 염색

전기영동 트레이에 차가운 alkaline electrophoresis solution(TREVIGEN, USA)을 담고 25V, 0.3A, 30분간 전기영동하였다. 그 후 증류수로 5분씩 3회 세척하고 70% 에탄올로 5분 동안 처리하였다. 1시간 동안 말린 다음 SYBR Green(TREVIGEN, USA)을 50 μl를 떨어뜨려 염색시킨 후 antifade 용액(Invitrogen, USA)을 떨어뜨리고 커버슬라이드를 덮었다.

3) 관찰 및 데이터분석

50개의 세포를 통계내었으며 5시간 단위로 5번 측정하였다. CCD camera가 부착된 형광현미경(Leica, Germany)를 사용하여 200배로 확대하여 검경하였다. 세포의 DNA손상도를 Komet6.0 프로그램(ANDOR, USA)을 통해 분석하였다. 100개의 세포를 무작위로 측정 후 이미지가 겹쳐져 ROI(Region Of Interest)에 비해 높은 Background를 가진 50개의 데이터는 제외하였다. 이는 정확한 측정값 통계에 영향을 미칠 수 있다. 또한 tail length만을 측정하여 DNA 손상을 평가할 경우 실제 유발된 손상이 지나치게 확대 해석될 수 있다는 단점이 있다<sup>14,15</sup>. 따라서 본 연구에서는 Tail moment 값을 사용하였다.

$$\text{Tail moment}^d = \frac{|\text{Tail mean}^a - \text{Head mean}^b| \times \text{tail\%DNA}^c}{100}$$

<sup>a</sup>tail 부위의 염색강도의 평균값

<sup>b</sup>head 부위의 염색강도의 평균값

<sup>c</sup>전체염색강도에 대한 tail 부분의 비율

<sup>d</sup>값이 증가할수록 DNA가 손상을 많이 받은 것을 의미

III. 결 과

1. MRC-5와 SK-N-SH의 DNA 손상도 비교

양성자빔을 정상섬유모세포인 MRC-5와 신경모세포종 세포인 SK-N-SH에 각각 2Gy, 5Gy, 8Gy를 조사한 후 형광현미경을 통하여 사진을 획득한 후 Tail moment를 측정하였다. 양성자빔을 조사하지 않은 대조군(control)의

MRC-5의 평균값은 13,9886이었고 SK-N-SH의 평균값은 15,2802이었다. 이러한 약간의 손상은 양성자빔 조사 시설로 이동하는 과정에서 incubator를 벗어난 배양환경의 변화와 이동 중 겪게 된 미미한 충격에 의해 일어난 것으로 생각된다.

양성자빔 2Gy 조사한 후 MRC-5의 Tail moment 의 평균값은 31,1774이었고 SK-N-SH의 평균값은 39,5842이었다. SK-N-SH의 값이 약 8이 높았다. 양성자빔 5Gy 조사한 후 MRC-5의 Tail moment 의 평균값은 39,2602이었고 SK-N-SH의 평균값은 51,3822이었다. SK-N-SH의 손상도가 높아졌으며 MRC-5에 비해 약 12가 높았다. 양성자빔 8Gy 조사한 후 MRC-5의 Tail moment 의 평균값은 50,3202이었고 SK-N-SH의 평균값은 78,6346이었다(Table 2). MRC-5의 손상도가 굉장히 높아졌으며 동시에 각각의 측정값의 표준편차가 커졌다. 이는 양성자빔에 의해 DNA가 엄청난 손상을 받고 Head를 벗어난 Tail의 양이 늘어나 사진상의 백그라운드가 높아짐으로써 정확한 Tail moment 측정이 어려워져 표준편차가 늘어난 것으로 생각된다. 또한 해성모양의 tail이 길게 늘어진 모습이 아닌 달무리처럼 Head주변에서 DNA 조각들이 모여 있는 모습이 자주 관찰되었다. 이는 충분히 손상받았음에도 불구하고 Tail% DNA측정값이 tail이 길게 발생한 경우보다 낮게 나올 수 있다. 따라서 측정 결과값보다 더 큰 손상을 받았을 것이라 생각된다. 즉 선량이 늘수록 MRC-5와 SK-N-SH의 손상도 차이는 커졌지만 MRC-5의 손상도가 위험수준으로 커지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1).

2. MRC-5와 SK-N-SH의 DNA 손상에 대한 회복을 비교

양성자빔을 정상섬유모세포인 MRC-5와 신경모세포종 세포인 SK-N-SH에 각각 2Gy, 5Gy, 8Gy를 조사한 후 incubator(37℃, 5% CO<sup>2</sup>)에서 회복 가능한 환경을 만들어 준 후 5시간 단위로 tail moment를 재측정하였다. 양성자빔을 조사하지 않은 대조군(control)인 MRC-5와 SK-N-SH의 경우 완벽히 회복하였다. 2Gy를 조사한 경

Table 2. Tail moment of comet irradiated with proton beam (mean±standard deviation)

	control	2Gy	5Gy	8Gy
MRC-5	13,9886±8,0043	31,1774±9,402156	39,2602±12,76336	50,3202±23,17155
SK-N-SH	15,2802±9,6029	39,5842±9,399569	51,3822±15,76782	78,6346±11,55692

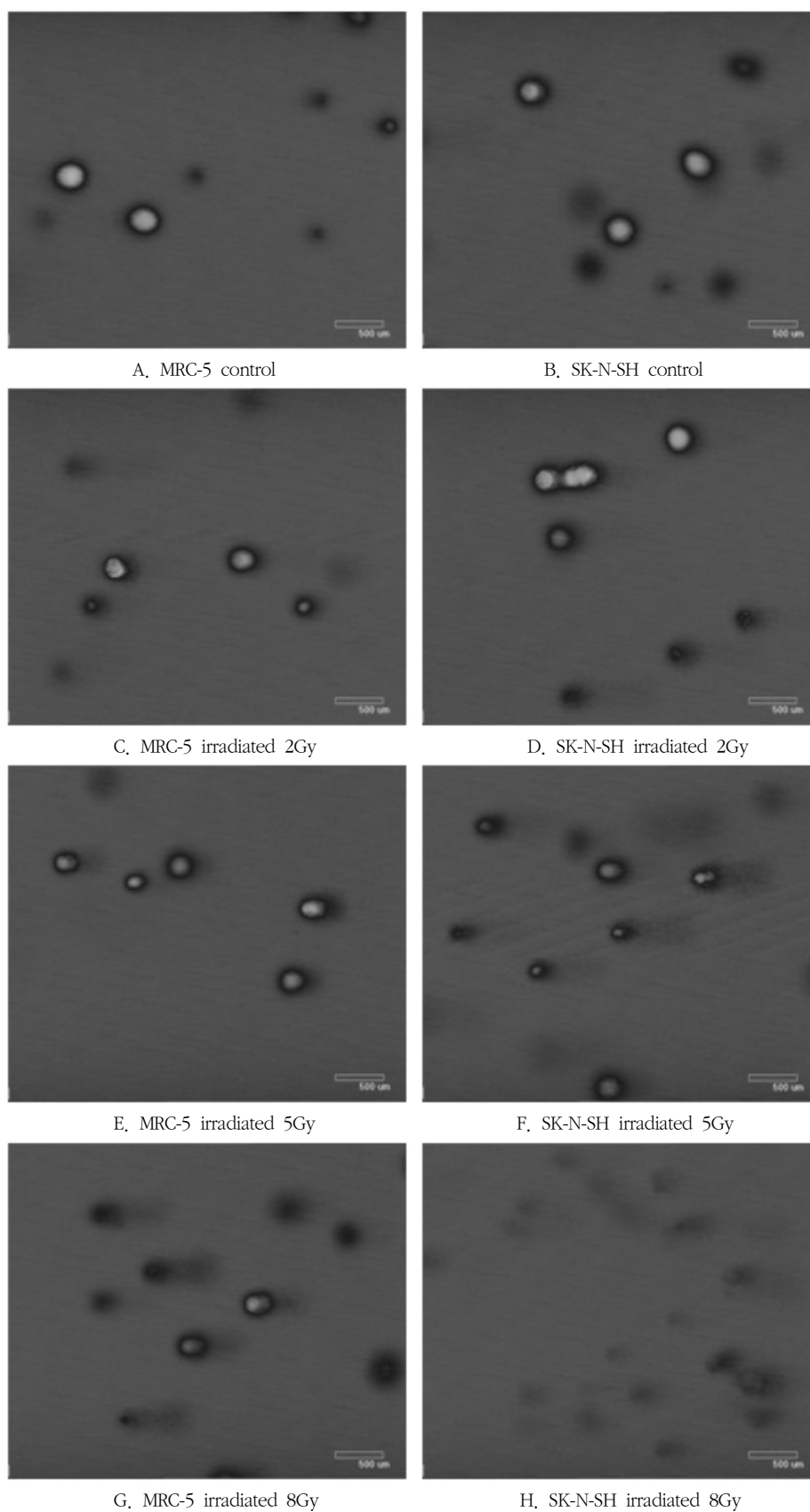


Figure 1. Comet image represented various degree of DNA damage

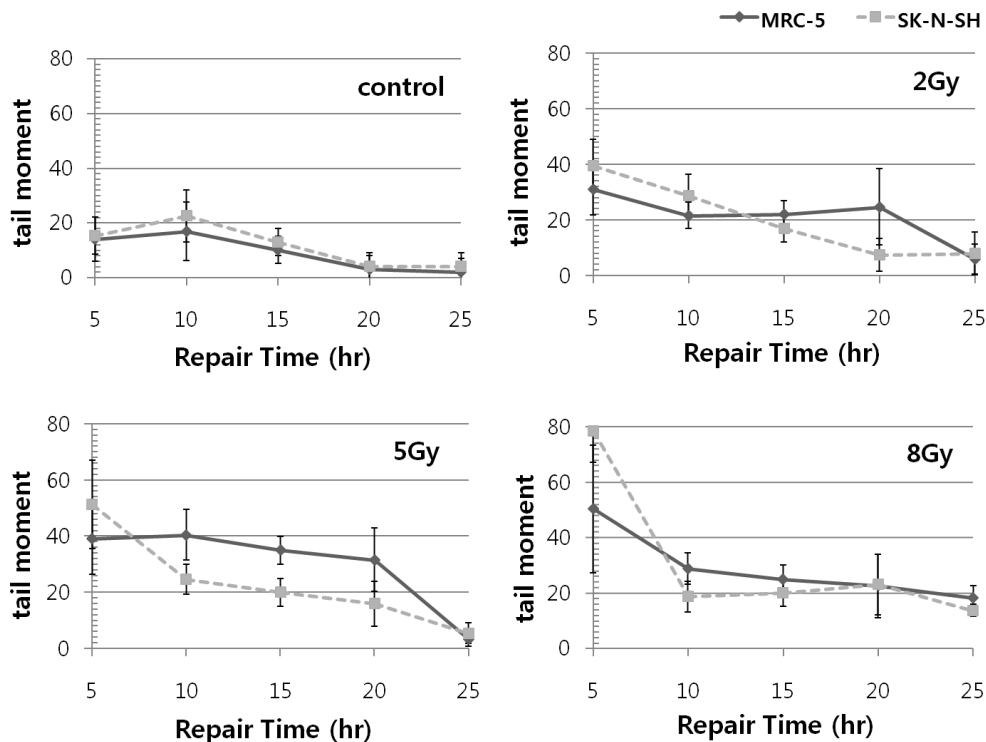


Figure 2. MRC-5 were failed to fully recover after exposure to 8Gy (mean  $\pm$  standard deviation)

우 역시 거의 회복하였다. 5Gy를 조사한 경우 MRC-5가 더딘 모습을 보였지만 25시간 안에 거의 회복하였으며 SK-N-SH 역시 25시간 후 측정결과 거의 회복하였다. 8Gy를 조사한 경우는 두 종류의 세포 모두 어느 정도 회복의 양상을 보였지만 25시간 안에 완벽히 회복하지 못하였다. 특히 MRC-5의 경우는 더 큰 손상도를 받은 SK-N-SH에 비해 회복량이 적었다. 이는 저선량이 아닌 고선량의 양성자빔을 조사시 일시적으로는 종양세포가 정상세포에 비해 더 큰 손상을 받지만 시간이 흐름에 따라 정상조직에 비해 더 빨리 회복할 수도 있는 가능성을 알려준다. 따라서 고선량 조사 후 MRC-5가 회복이 거의 불가능한 DSB의 출현을 확인하는 실험이 필요할 것으로 생각된다(Figure 2).

#### IV. 결론 및 고찰

본 연구는 양성자 치료시 발생할 수 있는 정상조직의 손상과 이에 따른 회복가능성을 알아보기 위해 진행하였다. 따라서 정상섬유모세포인 MRC-5와 신경모세포종세포인 SK-N-SH에 양성자 빔을 조사한 후 Alkaline

comet assay를 통하여 DNA의 손상도를 측정하고 시간이 지난 후 재측정을 하여 회복률을 알아보았다.

그 결과 같은 선량에서 신경모세포종 세포에 비해 정상섬유모세포의 손상도는 낮았지만 선량이 증가할수록 정상섬유모세포 역시 위험수준으로 손상받는다라는 것을 알 수 있었다. 이는 선량이 커질수록 SOBP 영역내에서 LET의 차이가 커져 세포생존율 또한 차이가 커진다는 사실을 고려했을 경우<sup>11)</sup> 고선량으로 양성자 치료시 치명적으로 정상섬유모세포가 손상받을 수 있다는 것을 의미한다.

또한 회복률을 측정한 결과 8Gy 조사했을 때 두 종류의 세포 모두 어느 정도 회복의 양상을 보이다가 10시간 후부터 더디게 회복되었으며 MRC-5의 경우 2Gy, 5Gy에 비해 회복률이 현저히 낮아짐을 알 수 있었다. 이러한 점에서 고선량에서는 SK-N-SH와 비교했을 때 MRC-5의 회복가능성이 낮아짐을 확인하였으며 이는 회복되는데 다소 시간이 걸리거나 회복 불가능한 수준의 DNA손상, 즉 DSB가 발생했음을 말해준다. 추후 회복의 가능성이 거의 없는 DNA의 DSB만 단독 측정을 위해 neutral comet assay<sup>16)</sup>를 실시하여 이러한 회복의 실패가 극심한 손상에 의해 불가능해졌는지 확인할 필요가 있다. 또한 추가적으로 정상섬유모세포와 신경모세포종 세포의 다양한 세포주

실험이 필요하며 방사선 감수성이 높은 특정 기관들 및 환경에 대한 실험을 시행하여 본 결과를 토대로 좀 더 폭넓은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

고선량을 조사하였을 경우 종양조직의 경우 손상받은 후 회복에 실패하여 재발의 가능성이 줄어드는 반면 정상 조직은 회복에 실패하여 불필요한 부작용 유발로 이어질 수 있다. 따라서 종양조직의 재발은 차단하고 정상조직의 회복은 유발시키는 적정 선량 및 재조사 간격을 통해 향후 성공적인 양성자 치료가 가능할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Miller DW: A review of proton beam radiation therapy. *Med Phys*, 22, 1943-1954, 1995
2. Cambria R, Herault J, Silari M, Chavelt P: Proton beam dosimetry: a comparison between the Faraday cup and an ionization chamber, *Journal of Physics in Medicine and Biology*, 42, 1185-1196, 1997
3. G. Kraft: The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions, *Journal of Strahlentherapie und Onkologie*, 166, 10-13, 1990
4. Ian J. Constable, Andreas M. Koehler: Experimental ocular irradiation with accelerated protons, *Journal of Investigative Ophthalmology*, 13(4), 280-287, 1974
5. Reiner B. Bonnet, David Bush, Gregory A. Cheek, Jerry D. Slater, David Panossian, Christian Franke and James M. Slater: Effects of Proton and Combined proton/photon Beam Radiation on Pulmonary Function in patients with resectable but medically inoperable non-small cell lung cancer, *CHEST*, 1803-1810, 120, 2001
6. D.T.L. Jones, A.N. Schreuder: Magnetically scanned proton therapy beams: rationales and principles, *Journal of Radiation Physics and Chemistry*, 61, 615-618, 2001
7. John J. Coen and Anthony L. Zietman: Proton radiation for localized prostate cancer, *Nature Reviews urology*, 6, 324-330, 2009
8. Torunn I Yock and Nancy J Tarbell: Technology Insight: proton beam radiotherapy for treatment in pediatric brain tumors, *NATURE CLINICAL PRACTICE ONCOLOGY*, 1, 97-103, 2004
9. Taeko Matsuura, Yusuke Egashira, Teiji Nishio: Apparent absence of a proton beam dose rate effect and possible differences in RBE between Bragg peak and plateau, *Journal of Medical Physics*, 37(10), 5376-5381, 2010
10. D.bettega, P. calzolari, P. chauvel: Radiobiological studies on the 65MeV therapeutic proton beam at Nice using human tumour cells, *Journal of radiation biology*, 76(10), 1297-1303, 2000
11. ivan petrovic, aleksandra ristic-fira, danijela todorovic: Response of a radioresistant human melanoma cell line along the proton spread-out Bragg peak, *Journal of radiation biology*, 86(9), 742-751, 2010
12. Hada, M, B. M. Sutherland: Spectrum of complex DNA damages depends on the incident radiation, *Journal of Radiation research*, 165, 223-230, 2006
13. Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Journal of experimental cell research*, 175, 184-191, 1988
14. P. L. olive, D. Wlodek, R.E. durand, J.P. banath: Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis, *Journal of experimental cell research*, 198, 259-267, 1992
15. P. L. olive, J. P. banath, R.E. durand: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay, *Journal of radiation research*, 122, 86-94, 1990
16. J. P. banath, M. fushikiand P. L. olive: Rejoining of DNA single-and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation, *Journal of radiation biology*, 73(6), 649-660, 1998

• Abstract

## DNA Repair Characteristics of MRC-5 and SK-N-SH Irradiated with Proton Beam

Eun-Ae Choi · Bong-Soo Lee<sup>1)</sup> · Young-Ho Cho

*Department of Radiological Science, Catholic University of Daegu*

<sup>1)</sup>*School of Biomedical Engineering, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University*

The purpose of this study is to compare DNA repair characteristics of normal fibroblast cell (MRC-5) and neuroblastoma cell (SK-N-SH) induced by proton beam.

Cells were irradiated with 2Gy, 5Gy and 8Gy proton beam. The rate of DNA rejoining was measured by alkaline version of the comet assay. After a repair time, tail moment was measured again.

The tail moment of MRC-5 was lower than SK-N-SH. However, after 8Gy of exposure, the tail moment of MRC-5 was measured as 50.320223,17155 which represents dangerous level of DNA damage. The cells were repaired practically within 25 hours after 2 and 5Gy of exposure while they were not fully recovered after 8Gy of exposure. Especially, tail moment of MRC-5 after 25 hours was 18,15364,42849.

In the distal declining edge of SOBP, the RBE value is increased by high LET. The RBE differences of SOBP in high-dose were greater than low-dose. After the high-dose exposure, MRC-5 of normal fibroblast cell could lead to lasting DNA damage as shown in this study. In conclusion, we has to pay special attention when the region of the treatment volume is close to sensitive tissues.

---

**Key Words :** proton therapy, DNA, alkaline comet assay, MRC-5, SK-N-SH