

## 면역세포주에서 방사선에 의한 세포고사 관련 신호전달체계 및 적응반응

최무현, 양광희, 김희선, 정미선, 김차순, 진영우, 표석능<sup>1</sup>, 김종순  
한국수력원자력(주) 방사선보건연구원 방사선영향연구팀  
성균관대학교 약학대학 세포면역학실<sup>1</sup>

### 서 론

현재 방사선에 의해 유발되는 인체 위험에 대한 방호개념으로 선형무문턱 (Linear Non-Threshold, LNT) 가설에 의거하여 규제되어 오고 있는데 이 가설은 생물체에 독성을 보이는 고선량 방사선의 효과를 외삽하여 얻은 선량반응 모델이다. 그러나 이 가설은 약 25 cGy 이하의 저선량 범위에서의 생물학적 영향에 대해서는 명백한 현상과 기전을 제시하지 못하고 있다[1].

Atkinson (1989)은 방사선을 조사한 Algae가 대조군에 비해 성장속도가 빠르다는 것을 관찰하였고 [2], Luckey (1982)는 또한 기존의 자료를 정리하여 방사선 호메시스 개념을 제시하였는데 매우 낮은 선량의 방사선이 동물의 성장, 발달, 생식능력향상, 건강, 수명연장, 방사선 방호, 병원성 감염에 대한 저항력 획득, 면역력의 증강, 암 발생억제 등과 관련되어 있다고 주장하였다 [3].

이러한 방사선 호메시스 개념은 임상적으로 원자력 에너지의 효율적인 이용, 식량 생산의 향상 등과 같은 산업전반에 기여도가 클 것으로 기대되어 많은 연구자들로 하여금 저선량 방사선에 대한 생물학적 효과의 과학적 규명에 관심을 집중시키게 하고 있다. 그러나 호메시스 현상의 존재를 증명할 수 있는 많은 보고들에도 불구하고 명확한 기전이 밝혀지지 않아 선형무문턱 가설과 논쟁을 거듭하고 있다 [4,5,6,7]. 이것은 세포, 조직 및 개체의 항상성 기전으로 인해 25 cGy 이하의 방사선피폭으로 인한 인체영향을 관찰하기 어렵기 때문이다. 따라서 저선량 방사선 피폭이 생체에 자극 효과로 작용하여 고선량 방사선에 의한 생물학적 손상을 방어할 수 있을 것이라는 적응 반응 효과에 대한 연구에 관심이 모아지고 있다. Olivieri 등 (1984)은 림프구를 이용한 실험에서 저선량 방사선에 노출된 림프구는 고선량의 방사선에 의해 유도되는 염색체 이상에 저항성을 갖게 된다는 적응반응효과를 보고하였는데 [8], 이것은 방사선 호메시스의 또 다른 현상이라고 주장하였다.

방사선에 피폭된 세포는 DNA 손상복구가 잘 이행되지 않았을 시 암 발생의 위험에서 벗어나기 위해 세포는 오히려 세포고사를 유도하게 되는데, 결국 초기 저선량에 의해 적응된 세포에서 세포고사가 증가한다는 것이 사람말초혈액의 단핵세포를 이용한 연구에서 보고 된 바 있다. 한편, 쥐의 흉선세포를 이용한 연구에서는 세포고사가 오히려 감소한다고 보고 되었다 [9]. 또한, 방사선에 대한 적응반응효과로서 저선량 방사선에 피폭된 경우 DNA 손상복구율이 증가하는 것으로 보고 되었는데, 결국 방사선에 의해 DNA 복구율이 증가하면 그만큼 사멸세포 발생율이 감소한다고 말할 수 있다 [10].

본 연구에서는 현재까지 방사선 적응반응 효과로서 세포고사 및 DNA 회복과 관련된 세포내 단백질들이 단일 고선량 피폭과 비교하여 저선량 방사선에 의해 어떤 활성변화가 유도되고 결국, 고선량 방사선피폭에 대비하여 어떻게 세포 항상성을 증진시킬 수 있는지를 확인함으로써 저선량 방사선에 대한 긍정적인 생물학적 효과를 규명하는 것이다. 따라서 본 연구에서는 B lymphoma 세포주에 방사선을 조사하고 세포고사 현상과 그 신호전달체계 경로를 알아보고자 하였다.

### 재료 및 방법

세포배양 및 방사선 조사 : Human B lymphoblast cell (IM-9, EB-3)은 한국세포주은행에서 구입하여 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 혼합된 RPMI 1640 배지에서 부유 배양하였다.

방사선의 영향관찰을 위해 감마선 발생장치 (137Cs, IBL 437N)를 이용하여 0.8 Gy/min의 선량율로 조사하였다. 각 실험군은 총  $2 \times 10^6$  세포들을 60 mm dish에서 12시간 배양 후 저선량 방사선을 조사한 다음 4시간 후에 다양한의 고선량 방사선을 조사하여 시간별로 회수하여 이용하였다. 세포 생존율 확인 : 세포들은 각기 다른 선량으로 조사하여 96 well plate에 well 당  $1 \times 10^5$  세포들로 분주하고 시간별로 배양하였다. 배양 후 세포 생존율을 측정하기 위하여 MTT (2mg/ml)를 25  $\mu$ l 첨가하고 4시간 배양한 후 상층액을 제거하고 DMSO를 가하여 Formazane을 용해시킨 후 540 nm에서 ELISA 분석기를 이용하여 흡광도를 측정하여 생존 세포수를 확인하였다.

Caspase-3 활성화도 확인 : 배양된 세포들은 방사선 조사 후 시간별로 배양하고 PBS로 세척하여 Cell lysis buffer (Cell signaling)를 이용하여 총 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bradford (Bio-Rad)를 이용하여 정량하고, 20  $\mu$ g의 단백질을 Caspase-3 기질 (Calbiochem, colorimetric, 200 uM)과 혼합하여 제조사에서 추천하는 반응 조건에 따라 37°C에서 30-120분간 처리한 후 405 nm에서 ELISA 분석기를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

DNA fragmentation assay : 각 시간별, 선량별 실험 군들로부터 각각 세포 lysate을 얻어 원심 분리한 후 PBS로 3회 세척하고 LaboPass™ Blood mini DNA purification kit (LaboPass)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 정량한 후 1  $\mu$ g/well을 1.5% Agarose gel에 전기 영동하고 EtBr 용액에서 30분간 염색하여 DNA fragmentation을 확인하였다.

Western blot analysis : 방사선 조사 후 세포고사 및 DNA 손상복구와 관련된 단백질의 변화를 확인하기 위해 각 세포들을 PBS로 세척 후 protease inhibitor cocktail (PIERCE)이 첨가된 M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (PIERCE)를 가하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 BCA reagent (PIERCE)를 이용하여 정량하고 SDS-PAGE에 의해 분리한 후 PVDF membrane에 이적하였다. Membrane에 전이된 단백질은 해당되는 일차항체와 HRP (Horseradish peroxidase)접합 이차항체를 사용하여 결합시킨 후 X-선 필름에 노출하여 발현을 확인하였다.

## 결 과

### 1. 방사선 조사에 따른 세포 생존율의 변화

본 연구에서는 B-림프구에 대하여 방사선을 조사한 후 시간의 경과에 따른 생존 세포수를 관찰하였는데, 생존세포수는 조사량과 조사 후 배양시간에 의존하여 두 세포주에서 모두 감소하였다 (Fig. 1).

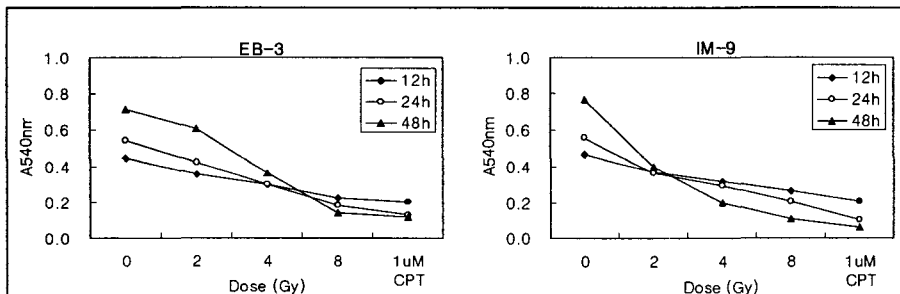


Fig. 1. Effect of  $\gamma$ -irradiation on cell viability in B cell lines. Cells were irradiated with various doses of  $\gamma$ -irradiation and were then incubated for indicated times. Viability of cells was determined by MTT assay.

2. EB-3 세포에서 방사선 조사에 따른 Caspase-3 활성화도 변화

많은 세포고사 과정에서 caspase-3의 활성화가 보임에 따라 방사선에 의한 세포고사에 있어서 caspase-3의 관련성을 확인하고자 하였다. Campothecin (10 μM)을 양성대조군으로 하여 방사선을 조사한 세포주에서의 caspase-3의 활성을 비교해 본 결과, 방사선을 조사하지 않은 음성대조군에 비해 대체적으로 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 특히 2, 4 Gy의 저선량에서의 활성이 높게 나타남을 확인하였다. 이러한 연구결과는 방사선에 의한 세포고사 과정이 caspase-3 의존적인 과정이라는 것을 시사하였다 (Fig. 2).

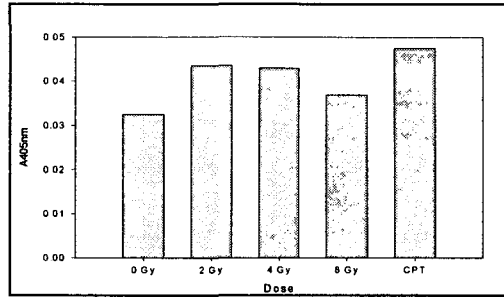


Fig 2. Caspase-3 assay of  $\gamma$ -irradiated EB-3 cell line. Cells were irradiated with various doses of  $\gamma$ -irradiation and were incubated for 5 days. After cells were harvested and lysed, supernatants were collected. Caspase-3 specific substrate (colorimetric substrate) were added to supernatants and measured at 405 nm by microplate reader.

3. EB-3 세포에서 방사선 조사 후 Bcl-2 family 단백질의 변화

Pro-apoptotic 유전자인 Bax은 방사선을 조사하지 않은 세포주와 비교하였을 때 2, 4, 8 Gy에서 발현이 증가했음을 확인할 수 있었다. 하지만 Bax의 endogenous inhibitor로 알려져 있는 Bcl-2의 발현은 2 Gy에서 발현이 약간 증가하였을 뿐 4, 8, 10 Gy에서는 방사선을 조사하지 않은 군에 비하여 유사한 발현 양상을 보였다. 또한 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-xL의 경우, 모든 실험군에서 유사한 발현 양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

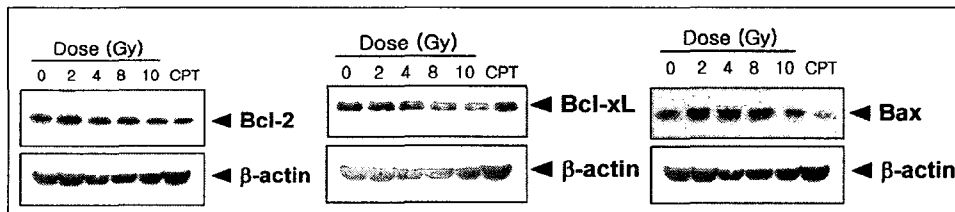


Fig 3. Western blot analysis of  $\gamma$ -irradiated EB-3 cell line. Cells were irradiated with various doses of  $\gamma$ -irradiation and were incubated for 72hrs. After cells were harvested and lysed, cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-Bax antibody, anti-Bcl-2 antibody and Bcl-xL antibody, respectively.

4. IM-9 세포에서 방사선 조사 후 DNA fragmentation 변화

방사선 조사 후 세포고사를 확인하기 위해 세포고사의 전형적인 특성인 DNA fragmentation을 확인하였다. 실험결과 1.5, 5 cGy의 저선량 방사선에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았으나, 적응선량을 조사한 군과 조사하지 않은 군 모두에서는 선량에 의존적으로 DNA fragmentation이 일어남을 확인하였다 (Fig. 4). 적응반응효과로서 5 cGy의 저선량을 먼저 조사하였을 때에는 DNA fragmentation 효과가 감소하는 것으로 나타났

다. 특히 방사선 조사 후 20시간대에 감소현상이 보였다.

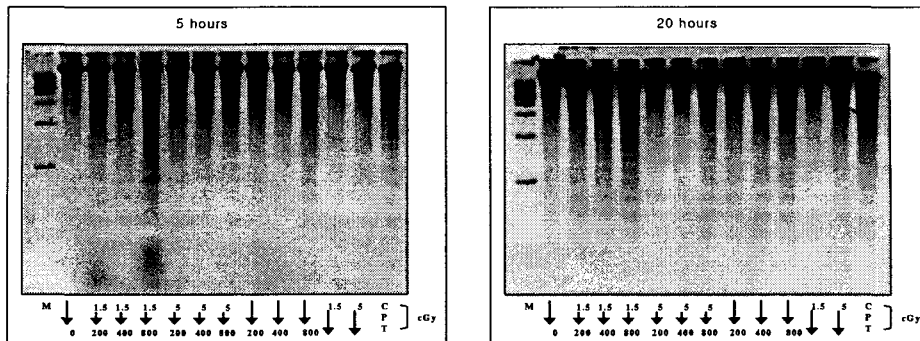


Fig. 4. DNA fragmentation analysis of  $\gamma$ -irradiated IM-9 cell line. Cells were irradiated with adaptive doses (1.5, 5 cGY) of  $\gamma$ -irradiation and then were irradiated with challenged doses (2, 4, 8 Gy). DNA was collected by DNA isolation kit. Each wells were loaded  $1\mu\text{g}$  DNA on 1.5% agarose gel.

5. IM-9 세포에서 방사선 조사 후 세포고사 관련 단백질의 변화

Western blot 결과 Caspase 및 Bcl-2 family 단백질의 발현양은 변화되지 않았으나, 단지 PARP 와 p53 단백질만이 저선량을 제외한 선량에 의존적으로 활성화됨을 확인하였다 (Fig. 5). 이번 결과에는 보여주지 않았으나, Pro-Apoptotic 단백질인 Bax, Bak, Bid의 경우 역시 발현양은 변화하지 않았다. Western blot의 결과로 볼 때, 방사선 조사에 의한 IM-9 세포고사 과정은 Caspase의 활성화와 무관한 다른 pathway를 통하여 세포고사가 이루어짐을 확인하였다.

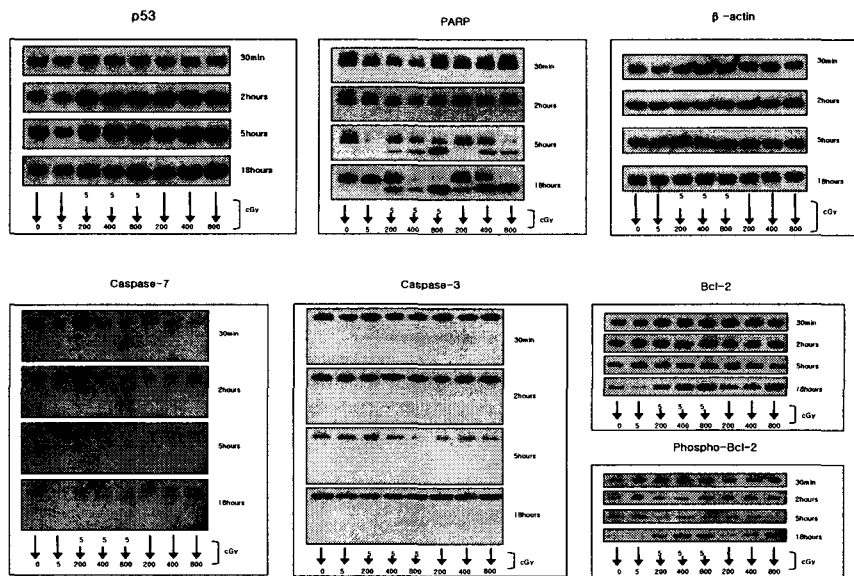


Fig. 5. Western blot analysis of  $\gamma$ -irradiated IM-9 cells. Cells were irradiated with adaptive doses (1.5, 5 cGY) of  $\gamma$ -irradiation and then were irradiated with challenged doses (2, 4, 8 Gy). After each cells were harvested and lysed, cell lysates were subjected to immunoblotting with antibodies which was related with apoptosis.

## 고 찰

자외선 (UV)과는 달리 전리방사선에 의한 DNA 손상은 단일가닥 절단 (SSB), 이중가닥 절단 (DSB), DNA-DNA cross links, DNA-단백질 cross links를 유발하는 것으로 알려져 있는데, 염색체이상, 미소핵, 세포사, 형질전환 등의 생물학적 효과는 대부분 이중가닥 DNA 절단과 연관되어 있다고 한다 [11]. 전리방사선에 의해 초래되는 이중가닥 DNA 손상은 DNA 복구기전, 세포주기의 지연, 세포고사 등과 같은 신호전달 경로를 자극한다. 이러한 손상반응경로는 게놈 복구를 촉진하고 선천적 변이의 축적을 저지한다. 수많은 종양세포에서 이 경로를 구성하는 분자들이 결실되어 왔다고 보고 되어, 이 경로가 종양형성을 제한하는데 주요한 작용을 하는 것으로 여겨졌다 [12]. 수많은 손상경로 중 중요한 분자의 하나인 Chk2는 ATM 단백질에 의해 활성화되어 DNA 합성과 세포주기를 조절한다. 게놈 손상에 의해 활성화된 Chk2는 Cdc25c의 작용을 억제하여 S 혹은 G2 기에 있는 세포가 유사분열기로 진행되는 것을 억제한다. 그리고 Chk2는 p53의 활성을 억제하는 mdm2를 제거하기 위해 p53의 serine 20 부위를 인산화 시키고, 전사인자로서 p53의 작용과 관련된 serine 15 부위를 인산화 시켜 p53의 핵내 축적을 유도한다 [13]. 축적된 p53은 세포고사를 유발하는 bax와 같은 유전자의 전사를 유도하고, Cdks를 억제하는 p21<sup>WAF-1/CIP-1</sup>을 활성화하여 G1기 지연을 유발시킨다 [14]. 전리방사선에 의한 게놈 손상 반응과 관련된 다른 분자는 ATM family에 속하는 DNA-PK이다 [15]. DNA-PK는 450 kDa의 분자량을 가지고 있는 DNA-PKcs와 Ku70/Ku86의 복합체로 이루어져 있으며 Ku70/86은 손상된 이중가닥 DNA를 인지하여 결합하고, 손상된 가닥은 DNA-PKcs의 작용에 의해 복구되는 것으로 알려져 있다[15]. DNA 복구가 제대로 이루어지지 않은 세포는 결국 Caspase 단백질들의 활성화에 의해 세포고사를 유도한다. AIF(Apoptosis inducing factor)는 미토콘드리아에 존재하는 flavoprotein으로서 세포고사가 유도될 때 미토콘드리아로부터 핵 내로 전위하여 세포고사를 유도하는 단백질로 알려졌으며, Caspase에 비의존적인 경로를 통한 세포고사에 중요한 매개체로서 작용하는 단백질이다 [16]. 또한 PARP-1의 활성화는 AIF의 핵 내 전위를 위해 필요하며 이는 PARP-1 의존적인 세포고사에 AIF가 중요함을 시사한다 [17]. 이번 실험결과 EB-3 세포의 경우에는 방사선에 의해 유도되는 세포고사 효과에서 Caspase-3의 활성화 증가로 인해 Caspase 의존적 세포고사 경로를 통하는 것과 비교 (Fig. 2, 3)하여 IM-9 세포는 Caspase 및 Bcl-2 family의 단백질의 활성화 양적인 변화가 없었다. 또한 PARP 단백질은 Caspase의 활성화와 무관하게 cleavage가 일어남을 확인 하였다 (Fig. 5). 이 논문에 결과를 제시하지는 않았으나 세포고사의 다른 경로인 Ceramide 관련 JNK 단백질의 활성화로 인한 세포고사의 가능성을 확인하기 위해 인산화 JNK 단백질의 Western blot 결과, 변화가 없었음을 확인하였다. 이는 IM-9 세포의 경우 방사선에 의해 유도되는 세포고사에서 Caspase와 무관하게 PARP 단백질의 활성화에 의한 AIF 단백질이 핵 내로 전위되어 세포고사를 유도할 것이라는 가정을 제시한다. 이러한 세포고사 기전의 발견은 악성 림프종에 대한 방사선 치료시 세포고사를 일으킬 수 있는 약물을 병행함으로써 암 치료효과를 증진시킬 수 있으리라 생각된다.

DNA 복구인자인 ATM 및 DNA-PK 등이 활성화되면 세포주기를 지연시키는 것으로 알려졌는데, 최근, ATM 및 DNA-PK의 활성을 억제하였을 때 적응반응 효과가 나타나지 않았다고 Miura등 (2002)의 보고에서도 증명되고 있다 [18]. 이러한 보고에서와 같이 본 연구에 결과를 보여주지 못했던 세포생존율에 대한 적응반응 현상이 IM-9 세포주에서도 나타나지 않았으며 ATM과 DNA-PK의 활성화변화가 일어나지 않는 것을 확인하였다. 결국, 저선량 방사선이 핵내 DNA 국소부위에 손상을 주고 이것을 회복시키기 위한 다양한 관련 단백질과 효소들의 축적됨으로써 적응반응효과를 유도시킨다는 Ikushima 등 (1996)의 설명과 연관하여 볼 때 [19], 말초혈액 림프구의 적응반응 효과는 DNA 손상의 회복에 의한 결과일 것으로 생각된다.

따라서, 인체세포에서 관찰되는 적응반응효과는 DNA 손상 회복 이외에 세포고사 등이 관련되기 때문에 적응반응현상에 대한 메커니즘을 규명하기 위해서는 세포내 DNA 손상에 의해 활성화되는 단백질과 세포고사 및 DNA 손상 회복과 관련된 신호전달체계에 대해 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

#### 참고문헌

- 1) Stebbing, Sci Total Environ., 22(3):213-34. (1982).
- 2) Atkinson JL, Sundt TM Jr, Dale AJ, et. al., Neurosurgery,. 171-8. Review. (1989)
- 3) Luckey TD. Health Phys. 771-89. Review. (1982)
- 4) Land CE. Cancer. Aug 15;46(4 Supp 1):868-73. (1980)
- 5) Miller MH, Rice NS. Br J Ophthalmol., 584-90. (1991)
- 6) Parsons PA. Health Phys., 513-6. (2002)
- 7) Dominguez, I., Panneerselvam, N, et. al. Mutation Research, vol. 301, 135-141.(1993)
- 8) Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Science. 594-7. (1984)
- 9) Gong SL, Liu SC, Liu JX, Zhang YC, Liu SZ. Biomed Environ Sci. 180-188. (2000)
- 10) Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 379-89. (2001)
- 11) Smith ML, Chen IT, Zhan Q, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Oncogene., 1053-9. (1995)
- 12) Hirao A, et. al. Science 287: 1824-182. (2000)
- 13) el-Deiry WS. Semin Cancer Biol 8: 345-357. (1998)
- 14) Blunt T, et al. Cell., 813-23. (1995)
- 15) Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GC, Demengeot J, Gottlieb TM, MizutaR, Varghese AJ, Alt FW, Jeggo PA, et al. Cell., 131- 42. (1993)
- 16) Nicholas Joza. et. al. Nature., 549-554. (2001)
- 17) Seong-Woon Yu. et. al. Science. (2002)
- 18) Miura Y., Abe K., Urano S., Furuse T., Noda Y., Tatsumi K. and Suzuki S., Int. J. Radiat. Biol., 913-921. (2002)
- 19) Ikushima T., Aritomi H., Morisita J., Mutation Research, vol. 358, 193-198. (1996)