

## 인체 임파양세포에서 G<sub>2</sub>기 염색체의 방사선 감수성

연세대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 연세암센터

성      진      실

= Abstract =

### Radiation Induced G<sub>2</sub> Chromatid Break and Repair Kinetics in Human Lymphoblastoid Cells

Jinsil Seong, M.D.

Department of Radiation Oncology, Yonsei University College of Medicine, Yonsei Cancer Center, Seoul, Korea

In understanding radiosensitivity a new concept of inherent radiosensitivity based on individuality and heterogeneity within a population has recently been explored. There has been some discussion of possible mechanism underlying differences in radiosensitivity between cells. Ataxia telangiectasia (AT), a rare autosomal recessive genetic disorder, is characterized by hypersensitivity to ionizing radiation and other DNA damaging agents at the cellular level. There have been a lot of efforts to describe the cause of this hypersensitivity to radiation. At the cellular level, chromosome repair kinetics study would be an appropriate approach.

The purpose of this study was to better understand radiosensitivity in an approach to investigate kinetics of induction and repair of G<sub>2</sub> chromatic breaks using normal, AT heterozygous (ATH), and AT homozygous lymphoblastoid cell lines. In an attempt to estimate initial damage, 9-β-D-arabinosyl-2-fluoroadenine, an inhibitor of DNA synthesis and repair, was used in this study.

It was found from this study that radiation induces higher chromatid breaks in AT than in normal and ATH cells. There was no significant differences of initial chromatid breaks between normal and ATH cells. Repair kinetics was the same for all. So the higher level of breaks in AT G<sub>2</sub> cells is thought to be a reflection of the increased initial damage. The amount of initial damage correlated well with survival fraction at 2 Gy of cell survival curve following radiation.

Therefore, the difference of radiosensitivity in terms of G<sub>2</sub> chromosomal sensitivity is thought to result from the difference of initial damage.

**Key Words:** Chromosomal radiosensitivity, Lymphoblastoid cells, 9-β-D-arabinosyl-2-fluoroadenine

### 서      론

방사선 감수성이 개체 마다 고유한 다양성을 지니며 이것이 유전적으로 결정된다는 것은 방사선 치료의 최

적 조건을 설정한다는 측면에서 볼 때 매우 중요한 의미를 갖게된다. 즉, 지금까지 받아들여지고 있는 정상 조직의 허용 선량이라는 것이 각 개인의 개별성이 무시된, 한 집단에 대한 평균적이고도 경험적인 개념이라는 점이며 따라서 동일한 선량을 일률적으로 적용할 때 예

기치 않은 부작용을 초래할 수 있다. 또한 유전적으로 결정된다는 것은 동일 개체 내에서 종양 세포 및 정상 세포에 같이 적용이 될 것이므로 유전적으로 민감한 개체에서는 정상 조직의 허용 선량 뿐만 아니라 종양을 치료하기 위한 방사선량도 낮을 것으로 예상된다<sup>11</sup>.

방사선 치료시 예기치 않게 심각한 부작용이 생겼던 환자들의 고유의 방사선 감수성이 높을 것이라는 가설은 실험적으로 증명이 되어 왔다. Weichselbaum 등<sup>2)</sup>은 방사선 치료 후 비정상적으로 심한 방사선 피부염을 보였던 환자들의 피부 섬유아세포를 취하여 실험적으로 방사선 생존율을 측정한 결과를 건강한 지원자들과 비교하였을 때 세포 생존 곡선의 보외수(extrapolation number)가 환자의 경우에서 현저하게 낮았다고 보고하였다. 유사한 결과가 Smith 등<sup>3)</sup>과 Wood 등<sup>4)</sup>에 의하여 보고되었으며 최근 Loeffler 등<sup>5)</sup>은 극심한 피부 반응을 보였던 유방암 환자의 피부 섬유아세포를 분리하여 대조군과 비교한 결과 세포 생존 곡선의  $\alpha$  값이 환자군의  $1.09 \pm 0.09$ , 대조군의  $0.76 \pm 0.17$  ( $p < 0.001$ )로 유의한 차이를 보였음을 보고하였다.

방사선 감수성이 극단적으로 높은 집단으로는 ataxia telangiectasia (AT), Bloom 씨 증후군, Fanconi 씨 증후군, Down 씨 증후군, 망막아세포 종양 같은 유전적 질환을 들 수 있다<sup>6)</sup>. AT는 신경계, 피부 및 면역계 등 신체의 여러 기관의 이상을 동반하는 질환으로서 전리 방사선에 극히 민감하고 암으로의 이환율이 높은 것이 특징이다<sup>7)</sup>. 세포의 분열 주기 중 G<sub>2</sub>기에 전리 방사선을 조사하면 DNA의 double strand break를 초래하며 이것은 방사선 조사 후 첫번째 분열 주기에서 염색분체의 결실(deletion) 등의 손상으로 나타나는 데 이러한 염색체의 방사선 감수성을 말초 혈액 임파구나 피부 섬유아세포에서 검사하였을 때 정상인에 비해 AT 환자에서 특히 높은 것으로 보고되고 있다<sup>8,9)</sup>. AT 세포의 과민성은 전리 방사선(ionizing radiation)에 의해 DNA가 손상되었을 때 이를 인식하여 복구하고 처리하는 과정에 결함이 있는 것으로 설명하고 있으나<sup>10)</sup>, 이를 뒷받침하는 연구가 미흡하다.

과민한 AT를 포함하여 개체 마다 고유하게 다른 방사선 감수성의 본질을 알고자 염색체의 방사선 감수성을 검사할 수 있다. 염색체의 손상은 그 즉시 복구 과정이 시작되므로 손상 정도를 가늠하기 위하여 분열 주기 염색체 검사를 시행하게 되면 미처 복구하지 못하고 남

아있는 잔여 손상만이 관찰되므로 방사선 감수성을 설명함에 있어서 결과적인 현상만으로는 불충분하다. 즉, 복구가 일어나지 않은 상태의 최초 손상과 그것이 복구되어가는 역동적 양상에 대한 이해가 있어야 방사선에 대한 감수성이 최초 손상의 정도의 차이에 기인한 것인지 아니면 같은 정도의 최초 손상이지만 복구되어가는 양상의 차이에 기인한 것인지를 알 수 있다. 실험적인 방법으로 이를 알기 위하여 몇가지 시도가 있어 왔다. Iliakis 등<sup>11)</sup>은 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl adenine (ara-A)를 이용하여 염색분체 손상의 복구를 억제시켜서 G<sub>2</sub>기의 Chinese hamster 세포에서 방사선에 의한 염색체 손상이 6시간 까지 일정한 수준으로 유지되는 것을 관찰하였고 이것이 최초 손상일 것으로 추정하였다. 유사한 연구들이 연이어 보고되었으며<sup>12,13)</sup> Pandita 등<sup>14)</sup>은 premature chromosome condensation 방법으로 분열 중간기에서의 염색체 손상을 측정할 때 9- $\beta$ -D-arabinosyl-2-fluoroadenine (F-ara-A)를 이용하였다. ara-A의 불소화합물인 F-ara-A는 ara-A가 세포내에 풍부하게 존재하는 adenosine deaminase에 의해 불활성화되는 단점을 보완하여 세포내에서의 반감기가 더 길고 안정성이 있으므로<sup>15,16)</sup>, 염색체 손상의 복구를 강력하게 억제할 것으로 기대할 수 있다.

본 연구에서는 개체마다 다른 방사선 감수성의 차이를 규명하고자 방사선에 과민한 ataxia telangiectasia (AT)와 AT의 이형접합자(AT heterozygote, ATH) 및 정상인의 임파양세포주를 대상으로 방사선에 의한 염색체 손상 및 복구의 역동학을 연구하였다. 즉 F-ara-A를 사용하여 염색체의 최초 손상을 측정하고 이후 복구가 진행되는 역동적인 양상을 분석하며 또한 방사선 감수성의 궁극적인 결과인 세포 생존율과도 어떠한 관계가 있는지 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

인체의 말초 혈액에서 분리한 B-임 파구에 Epstein-Barr virus를 감염시켜 변형된 임파양세포주를 연구 재료로 하였다. AT 환자에서 유래한 것으로서 GM 717, GM 1525, GM 1526 등 세가지 세포주와 표현형은 정상이나 AT 유전자를 지니고 있는 ATH에서

유래한 GM 8388, GM 8390 등 세포주는 Human Genetic Mutant Cell Repository (Camden, NJ)에서 직접 구입하였고 건강한 정상인에서 유래한 세포주로서 3570P, 3585P, 3590P는 Dr. T.C. Hsu (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas)로부터 기증을 받아 사용하였다.

세포는 부유상으로 자라며 일정 습도 및 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub>의 세포 배양기에서 배양하였다. 세포 배양액으로는 RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 배양액에 열처리한 우태아혈청 20% (Gibco, Grand Island, NY) 페니실린 100 units/ml (Gibco, Grand Island, NY), 스트렙토마이신 100 μg/ml (Gibco, Grand Island, NY), 및 글루타민 2 mM (Sigma, St. Louis, MO)을 첨가한 것을 사용하였다. 실험 24시간 전에 지수적으로 자라는 세포를 취하여 각 실험군 마다 25 cm<sup>2</sup> flask에 배양액 10 ml당 5 × 10<sup>5</sup>개의 세포를 준비하되 이 때는 72시간 동안 투석시켜서 핵산염을 제거시킨 배양액을 사용하였다.

염색체 손상의 복구를 억제하기 위한 F-ara-A는 Dr. William Plunkett (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas)으로부터 기증을 받아 사용하였으며 인산 완충액에 1 mM의 농도로 냉동 보관하고 실험시에는 녹여서 1:100으로 희석하여 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 방사선에 의한 세포의 생존곡선

Limiting dilution assay를 이용해서 다음과 같이 생존 곡선을 구하였다. 배양된 culture flask에서 세포를 꺼내어 trypan blue (Gibco, Grand Island, NY) 염색으로 세포 수를 센 다음 15 ml 시험관 6개에 적절한 수의 세포를 준비하였다. 이 때 필요한 세포 수는 방사선 조사량에 따라 대조군의 9.5 × 10<sup>3</sup> cell/6 ml부터 3 Gy 조사군의 72 × 10<sup>3</sup> cell/6 ml까지 준비하였다. Cobalt-60 방사선 치료기(선량을 154 cGy/min)로 0, 5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy를 각각 조사한 후에 즉시 저온 보관하여 실험 도중 세포 분열이 일어나지 않게 하였다.

96 well plate를 해당 조사량 마다 2개씩 준비하여 plate의 12열 중 1열과 6열까지, 또 7열과 12열까지가 동일한 실험이 진행되게 하였다. 먼저 1열과 7열만 남기고 나머지 열의 well에 배양액을 50 μl씩 넣었다. 여

기에 세포를 1열 및 7열의 well에만 100 μl씩 넣은 후 1열에서 6열까지 또는 7열에서 12열까지 digital multi-channel pipette (Titertek, Finland)을 사용하여 연속적으로 세포 농도를 희석해 나갔다. 다시 각 well에 50 μl의 배양액을 추가한 후 뚜껑을 덮어 세포 배양기내에서 14일간 배양하였다.

14 일째에 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO)를 각 well에 25 μl씩 점적한 후 4~25시간 경과 후에 결과를 평가하였다. 즉, 20배의 확대경하에서 질 푸른색의 colony가 보이면 양성으로, 그렇지 않으면 음성으로 판정하였다. plating efficiency (PE)와 생존 분할값(SF)은 각각 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$PE = \frac{-\ln(Q_u/Q_u + P_u)}{N_u}$$

$$\ln(SF) = (Pt - Pu)(D/W) - \ln(Nt) + \ln(Nu)$$

Pt: 방사선 조사군에서 양성인 Well의 숫자

Pu: 대조군에서 양성인 Well의 숫자

Qu: 대조군에서 음성인 well의 숫자

D: 희석인자(=2)

W: 각 희석 농도에 해당되는 well의 숫자

Nt: 방사선 조사군에서 1열에 있는 세포의 숫자(최고 농도)

Nu: 대조군에서 1열에 있는 세포의 숫자(최고 농도)

즉, 이 방법에 의하여 세포 생존 곡선을 그린 후 방사선 조사량이 2 Gy일 때의 생존 분할(SF<sub>2</sub>)을 각각 구하였다.

### 2) 방사선 조사 후 F-ara-A 투여와 분열 증기 염색체 검사

염색체 손상의 복구 억제를 위한 실험으로는 100 μM의 F-ara-A를 방사선 조사 30분 전에 세포에 투여하였다. 방사선 조사는 Cobalt-60 방사선치료기(선량을 154 cGy/min)을 이용하여 0.5 Gy를 조사하였다. 실험의 진행은 대조군, 방사선 또는 F-ara-A 단독 투여군 및 F-ara-A 투여 후 방사선 조사군 모두에서 시간적으로 병행하여 시행하였다.

분열 증기 염색체 검사는 Hsu 등<sup>17)</sup>에 의해 개발된 방법을 사용하였다. 즉 0.04 μg/ml의 Colcemid (Gibco, Grand Island, NY)를 첨가하여 한시간 반응시킨 다음 1% 구연산나트륨으로 10분간 반응시키고

나서 메탄올과 빙초산을 3:1로 섞은 용액(Carnoy 용액)을 신선하게 즉시 준비하여 이것으로 세포를 고정시킨 후 물에 적신 유리 슬라이드에 도말하였다. 슬라이드를 공기 중에서 건조시킨 다음 2% Giemsa액(Gurr, U.K.)으로 염색한 후 광학 현미경하에서 검색하였다.

염색한 슬라이드는 각 실험군 마다 이배체의 분열 중기 100개씩 1000배율의 광학 현미경하에서 검색하였다. 염색체 손상 중 break와 gap의 구분이 애매한 경우에는 Chantham Barrs Inn 회의<sup>18)</sup>에서 추천한 방식을 따라 염색분체 두께보다 잘려진 조각의 떨어진 간격이 더 긴 경우를 break로 간주하였고 동염색분체의 절단은 한개의 break로 간주하였다.

3) Bromodeoxyuridine (BrdU) 표지 및 면역화학

염색법

Cobalt-60 방사선 치료기를 이용하여 0.5 Gy의 방사선을 조사한 직후에 1 μM의 BrdU (Gibco, Grand Island, NY)를 세포에 투여한 후 분열 중기 염색체 검사법과 같은 방법으로 실험을 진행하여 도말된 유리 슬라이드를 공기 중에서 건조한 후 면역 화학 염색을 시행하였다; 슬라이드를 110 °C의 오븐에서 30분간 가열한 후 4 N의 염산에 20분간 담갔다 0.1 M borax 완충액으로 세척하였다. 인산 완충액으로 세척한 후 blocking 액(1.5% 말혈청, 0.05% Tween-20, 0.1% 우혈청 알부민, Vector, Burlingame, CA)으로 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 다시 항 BrdU 마우스 항체 (Vector, Burlingame, CA, 인산 완충액의 0.2% 우혈청 알부민액으로 1:500 희석)로 37 °C에서 60분간 반응시키고 다시 인산 완충액으로 30분간 반응시켰다. 연이어 1% diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO)로 염색하고나서 pH 8.5의 17% Giemsa 액(Gurr, UK)으로 대조 염색하여 광학 현미경하에서 검색하였다.

대조군은 방사선 조사만 없을 뿐 실험의 진행은 방사선 조사군과 같은 방식으로 하였다.

결 과

1. 방사선 조사에 의한 세포 생존 곡선

각 세포주의 plating efficiency는 1.91±0.01%에서 8.70±0.17%로 다양하였으며 AT, ATH, 또는 정상인 세포주에서 서로 간에 뚜렷한 차이를 보이지는 않았다.

Table 1. Cell Survival Parameters of Lymphoblastoid Cells Following Radiation

Cell line	Plating efficiency (%)	SF2
Normal: 3570P	2.27±0.02	41.7±6.2
3585P	1.91±0.01	41.4±9.3
3590P	8.70±0.17	38.1±5.0
ATH: GM 8388	8.40±0.17	18.1±4.1
GM 8390	5.38±0.05	24.1±2.9
AT: GM 717	5.90±0.06	6.3±0.09
GM 1525	8.21±0.04	2.2±0.10

mean±SD

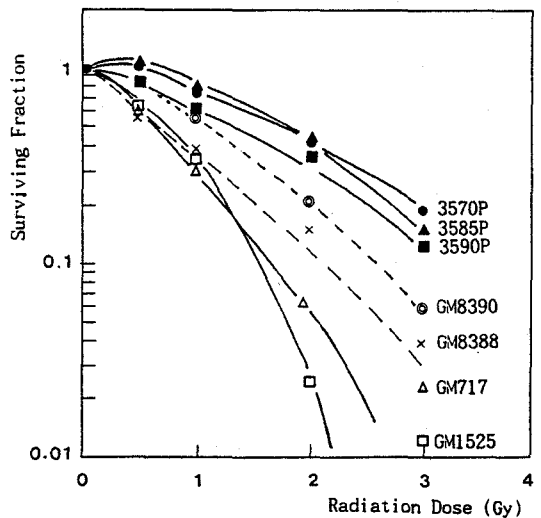


Fig. 1. Cell survival curves of lymphoblastoid cells following radiation. Cells are normal (3570P, 3585P, 3590P), ataxia telangiectasia (AT: GM 717, GM 1525), and AT heterozygotes (GM 8388, Gm 8390).

방사선에 의한 세포 생존율을 표현하는 지표인 SF2는 정상인 세포주가 38.1%에서 41.7%까지인 것에 비하여 AT에서는 2.2%에서 6.3%까지로서 방사선에 극히 민감한 것을 보여주며 ATH는 그 중간으로 나타났다 (Table 1).

이를 그림으로 나타내었을 때 AT 세포주의 생존 곡선은 기울기가 가파른 곡선으로서 ATH 및 정상인 세포주에 비하여 방사선에 민감하다는 것을 쉽게 알 수 있으며 ATH는 정상과 AT의 중간 정도의 민감성을 보여 주고 있다(Fig. 1).

Table 2. Percentage of Cells with Bromodeoxyuridine Labeled Metaphases

Cell line	Hours after radiation	Control				Irradiated (0.5 Gy)			
		1.5	2	3	5	1.5	2	3	5
3509P (normal)		0	11.7±0.58	50.9±0.32	89.0±0.44	0.33±0.57	0	15.9±7.2	77.1±5.8
GM 8390 (ATH)		0.33±0.57	7.7±1.52	44.3±2.9	94.8±7.7	1.1 ±0.35	0	14.2±0.8	78.9±9.5
GM 1525 (AT)		0.33±0.57	23.7±5.1	61.2±5.7	93.2±8.0	1	3±1	13.0±1.1	89.1±5.9

mean±SD

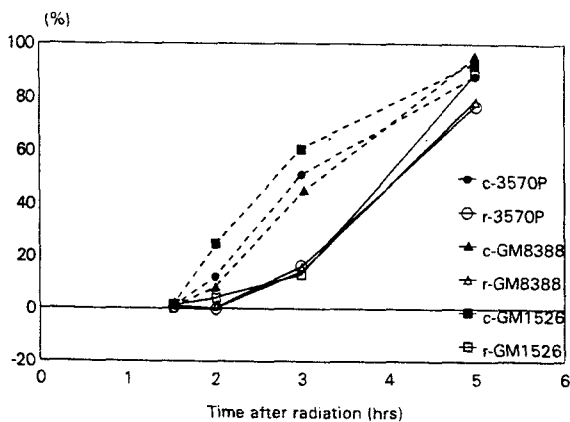


Fig. 2. Percentage of cells with bromodeoxyuridine labeled metaphases

## 2. 방사선 조사에 따른 세포 주기의 역동학

세포를 방사선 조사한 직후 BrdU를 투여하게 되면 조사 당시 합성기에 있었던 세포의 분획을 그 후 분열 중기에서 알아낼 수 있다. 합성기에 있던 세포만이 BrdU를 섭취했을 것이므로 BrdU에 대한 면역화학 염색에 양성을 보일 것이며 G<sub>2</sub>기에 있던 세포들은 음성을 보일 것이다.

Table 2 및 Fig. 2에서 분열 중기의 세포 중 방사선 조사 당시 합성기였던 세포의 분획을 보여주고 있다. 방사선 조사 후 1.5시간 및 2시간까지는 거의 100%가 G<sub>2</sub>기에 유래된 분열 중기 세포이며 2시간 이후에는 합성기에서 유래된 분열 중기 세포의 분획이 증가하는 것을 볼 수 있다. 이같은 양상은 세포종의 세포군에서 모두 같은 결과를 보이고 있다. 대조군에서는 1.5시간 이후에 합성기 세포의 분획이 직선적으로 상승을 보이는 반면 방사선 조사군에서는 이미 잘 알려져 있는 방사선에 의한 세포 분열의 지연(mitotic delay)으로 인하여 2시간이 지나서야 상승하며 5시간 쯤에는 대조군과 거의 같은 수준에 도달하고 있다. 정상인, ATH, AT

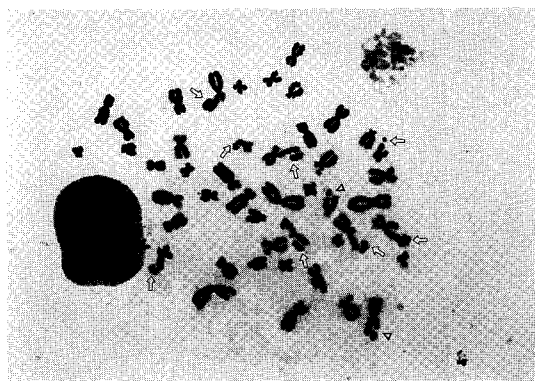


Fig. 3. Metaphase spread of ataxia telangiectasia (AT) cells following radiation. Chromatid breaks (arrows) and gaps (arrowheads) are shown in AT cells (GM 1526).

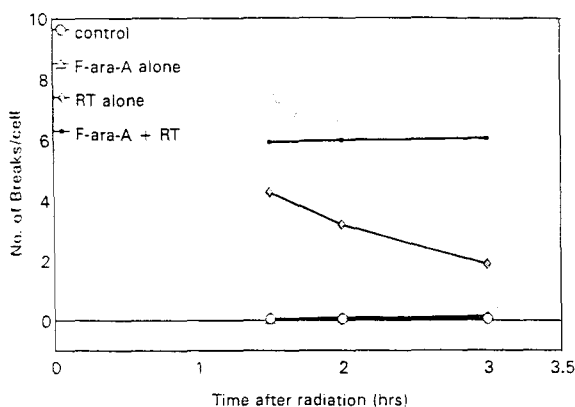


Fig. 4. Chromatid breaks following 0.5 Gy irradiation in ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells (GM 1526).

세포 모두가 유사한 결과를 보여주고 있어서 이들의 세포 주기의 역동학이 적어도 0.5 Gy 조사 시에는 별 차이가 없는 것으로 나타난다.

**Table 3. Summary of Radiation Induced G<sub>2</sub> Chromatid Breaks in Lymphoblastoid Cells with and without F-ara-A**

Group: Time (hr)	Normal			ATH		AT		
	3570P	3585P	3590P	GM 8388	GM 8390	GM 717	GM 1525	GM 1526
Control	0.10±0.04	0.08±0.02	0.08±0.02	0.11±0.01	0.10±0.01	0.12±0.02	0.09±0.03	0.05±0.02
F-ara-A: 1.5	0.04±0.03	0.06±0.02	0.12±0.02	0.10±0.05	0.11±0.02	0.13±0.03	0.10±0.02	0.05±0.01
alone 2	0.10±0.01	0.10±0.05	0.09±0.02	0.12±0.02	0.15±0.04	0.06±0.02	0.15±0.01	0.09±0.07
3	0.10±0.06	0.09±0.04	0.10±0.03	0.09±0.03	0.17±0.01	0.18±0.08	0.15±0.01	0.13±0.03
RT: 1.5	1.55±0.21	3.28±0.31	2.29±0.04	2.91±0.02	2.93±0.08	4.72±0.59	4.21±0.07	4.28±0.08
alone 2	1.28±0.56	2±0.15	1.91±0.07	1.97±0.09	2.05±1.06	4.07±0.83	3.90±0.17	3.2±0.20
3	0.65±0.11	0.56±0.06	0.67±0.08	0.59±0.02	0.63±0.06	2.69±0.58	2.64±0.22	1.88±0.23
F-ara-A: 1.5	3.72±0.20	4.34±0.44	3.2±0.02	3.73±0.22	4.27±0.08	5.93±0.55	5.97±0.03	5.95±0.01
+RT 2	3.72±0.32	4.24±0.50	3.35±0.12	3.75±0.04	4.0±0.02	5.95±0.13	5.96±0.39	6.01±0.03
3	3.73±0.27	4.32±0.09	3.42±0.31	3.70±0.07	4.10±0.05	5.99±0.08	6.0±0.34	6.07±0.28

mean±SD

그러므로 방사선 조사 후 적어도 2시간까지 보이는 분열 중기 세포는 조사 당시에 G<sub>2</sub>기에 있었던 세포에서 유래되었음을 알 수 있으며 3시간 쯤에도 전 중기세포의 15%만이 조사 당시에 합성기에 있던 세포였음을 알 수 있다.

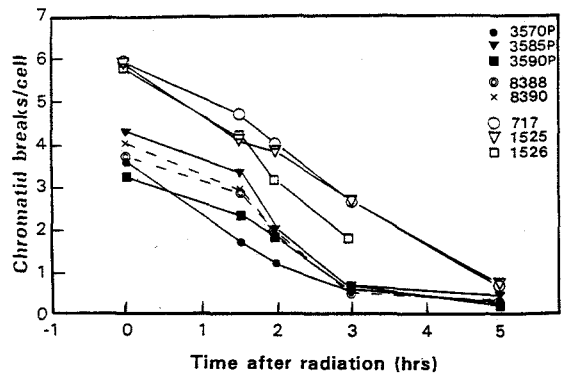
**3. 염색체의 최초 손상의 측정**

AT 세포주(GM 1526)에서 방사선에 의한 염색체의 손상(break)의 예를 Fig. 3에서 볼 수 있다. 이 세포주에서 방사선 조사시 F-ara-A 투여군과 투여하지 않은 군에서의 염색분체 손상을 시간별로 측정할 것이 Fig. 4에 나와 있다.

방사선 단독 조사군에서는 시간이 흐름에 따라 염색분체의 손상이 점차 감소되어가는 전형적인 양상을 볼 수 있다. 반면에 F-ara-A를 투여하고 방사선을 조사한 경우에는 어느 시각에서나 염색분체의 손상이 방사선 단독시 보다 더 많고 또한 일정한 수준으로 유지되는 것을 볼 수 있다. AT, ATH 및 정상인 세포주 모두에서 마찬가지로 F-ara-A 존재 하에 방사선을 조사한 경우는 방사선 단독에 비하여 더 많은 염색체 손상을 보이며 이 값이 어느 시점에서나 일정하게 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 이 값은 F-ara-A에 의하여 염색체 손상의 복구가 억제된 결과로서 복구가 일어나지 않은 최초 손상 그대로를 의미한다고 생각할 수 있다.

**4. G<sub>2</sub> 염색체의 방사선에 의한 손상 및 복구**

정상인과 ATH, 그리고 AT 세포주에서 방사선 단독 조사, F-ara-A 단독 투여, 그리고 F-ara-A 투여 후 방



**Fig. 5. Induction and repair kinetics of G<sub>2</sub> chromatid breaks**

사선 조사에 따른 G<sub>2</sub> 염색분체의 손상을 시간에 따라 얻은 결과가 Table 3에 요약되어 있다. 같은 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 실험 대상인 각종 세포주에서 보인 최초 손상은 다양한 결과를 보여서, AT는 ATH나 정상인의 세포주에 비하여 약 두배가량 높은 수준이었고 ATH 세포는 정상인 세포와 거의 비슷한 수준이면서 세포주끼리 약간의 차이를 보였다.

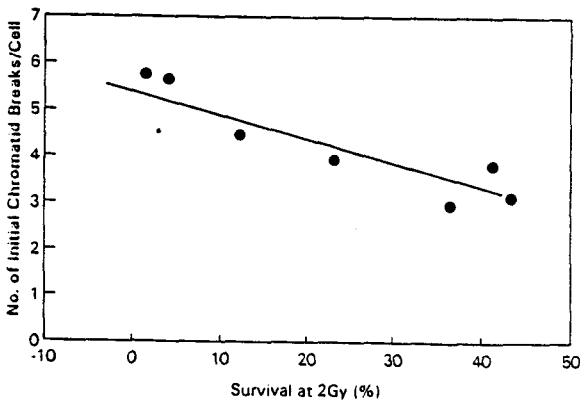
그러나 Fig. 5에서 정상인, ATH 또는 AT 등 어느 세포주에서도 염색분체의 손상이 복구되어져가는 양상이 3시간 까지는 유의하게 다르게 았다는 것을 보여주고 있다. 즉, 각 세포주에서 매 시간 마다의 손상 정도를 연결한 선들은 Y=-1.14X+B라는 Y축의 절편(B)이 서로 다르고 기울기가 약 -1.14인 선형 회귀방정식으로 요약 될 수 있다(Table 4). 그러므로 방사선에 대한 염색체의 감수성의 차이는 복구 양상이 달라서가 아

Table 4. Linear Regression of Chromosome Data

	Normal			ATH		AT		
	3570P	3585P	3590P	GM8388	GM8390	GM1525	GM1526	GM 717
A	-1.04	-1.27	-0.82	-1.04	-1.21	-1.10	-1.37	-1.07
B	3.49	4.61	3.35	3.99	4.44	5.96	6.05	6.09

Y=Ax+B, A: slope (mean A: -1.14) B: intercept

A: Survival at 2Gy vs. Initial Chromatid Breaks



B: Survival at 2Gy vs. Residual Chromatid Breaks

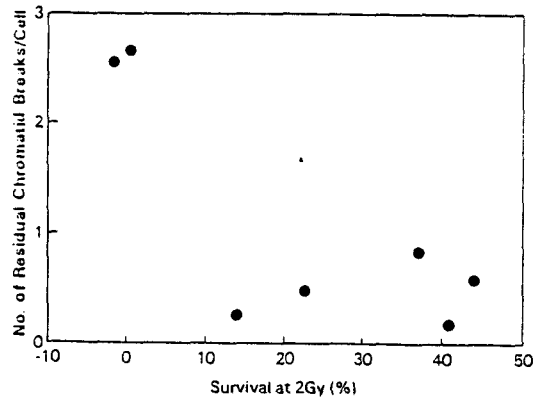


Fig. 6 A-B. Correlation of survival at 2 Gy (SF2) with chromosome data. A: SF2 vs. initial chromatid breaks showing negative correlation ( $p < 0.05$ ), B: SF2 vs. residual chromatid breaks.

니라 방사선에 의하여 유도되는 최초 손상의 정도 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

AT 세포는 계속 복구 과정이 진행되어 5시간에 이르면 정상인 세포와 같은 수준에 도달하고 있다. 세포 주기의 역동적 연구에서 보았 듯이 이 시기에 보이는 중기 세포는 방사선 조사 당시 합성이었던 세포들이므로 G<sub>2</sub>기 세포의 방사선 감수성과는 비교될 수 없다.

5. 세포 생존 곡선과 염색체 손상과의 관계

방사선에 의한 세포 생존 곡선에서 방사선 감수성을 가장 잘 대변하는 것으로 알려진 지표는 2 Gy에서의 생존 분획(SF2)로서<sup>19-21)</sup>이 SF2와 염색체의 최초 손상, 3시간 경과시 잔여 손상과의 상관 관계를 분석하였다.

SF2와 최초 손상은 상관 계수  $r^2 = -0.78$  ( $p < 0.05$ )로서 통계적으로 유의한 음의 상관 관계를 보였으나 SF2와 잔여 손상 간에는 상관 관계가 없는 것으로 나타났다(Fig. 6A-B).

고찰

상염색체의 열성 유전 질환인 AT 질환자의 비정상적인 방사선 과민성은 1973년 Higurachi와 Conen<sup>22)</sup>에 의해서 최초로 보고된 이후로 Rary 등<sup>23)</sup>이 AT 임파구를 대상으로, Natarajan과 Myers<sup>8)</sup>가 AT의 피부 섬유아세포에서 거듭 확인하였다.

AT의 방사선 과민성을 설명하기 위하여 여러가지 노력이 있어 왔다. Bates와 Lavin<sup>24)</sup>, Zampetti-Bosler와 Scott<sup>25)</sup>들은 정상 세포주에서 볼 수 있는 방사선에 의한 세포 분열의 지연 현상이 AT에서는 뚜렷하지 않음을 보고하였다. 또한 Painter와 Young<sup>26)</sup>은 AT 세포의 방사선 감수성은 방사선에 의해 손상받은 DNA의 복구에 결함이 있는 것이 아니라 이러한 DNA 손상을 효과적으로 복구하여 세포가 생존하는 데에 필수적인 분열 지연 현상이 시작되지 못하기 때문이라고 제시하였다. 반면에 Ford 등<sup>27)</sup>은 flow cytometry를 이용하여 [<sup>3</sup>H]thymidine이 표지된 분열 세포의 분할을 측

정한 연구 결과, AT 세포에서 방사선에 의한 세포 분열의 지연이 정상 세포에서 보다 미미하다는 점도 있으나 이것으로서는 AT의 방사선 과민성을 설명하기에 불충분하다고 지적하였다. 그보다는 방사선 조사시 AT 세포가 G<sub>2</sub>기에 축적이 되고 거기에서 세포사를 함으로써 그 다음 분열 과정으로 진행이 안되기 때문이라고 제시하였다. Tatsuka 등<sup>28)</sup>도 같은 결과를 얻어 AT 세포가 G<sub>2</sub>기에 축적이 됨을 재확인 하였으나 그의 연구에서는 AT와 정상 세포 모두에서 같은 정도의 분열 지연 현상이 나타났다. 요약하면 AT 세포의 방사선 민감성을 분열 지연 현상의 미약 또는 부재 등으로 설명하는 것도 연구자들 간에 일치를 보이지 않고 있으며 따라서 이러한 접근 방법은 불충분한 것으로 보인다.

Bender 등<sup>9)</sup>은 Autoradiography 실험을 통하여 방사선 조사시 AT, ATH, 정상인 임파구들의 G<sub>2</sub>기가 시간적으로 같았음을 보고하여 AT 세포의 G<sub>2</sub>기 축적설에 반박하였다. 본 연구의 BrdU 면역화학 염색 실험에서도 방사선 조사를 아니한 경우(대조군)에서 시간에 따른 BrdU 표지 양상이 세 종류의 세포들에서 유사하였다. 0.5 Gy의 방사선 조사 시에는 방사선에 의한 분열 지연 현상으로 인하여 시간에 따른 표지율이 대조군보다 낮았으나 역시 세포들 간의 차이는 없었으며 방사선 조사로부터 5시간 후에는 대조군과 같은 수준에 도달하였다. 이 결과를 통하여 AT 세포가 G<sub>2</sub>기에 축적되지 않음을 확인할 수 있을 뿐 아니라 방사선 조사로부터 3시간까지는 관찰되는 중기 세포가 G<sub>2</sub>기 세포라는 확신을 가질 수 있었다.

최근 Sanford 등<sup>29)</sup>은 분열 중기 염색체 검사법으로 말초 혈액 임파구에서 방사선에 의한 염색체 손상을 측정한 연구에서 AT, ATH, 정상인 세포 간에 손상의 절대 값이 다를 뿐 아니라 복구 양상의 차이가 있어서 결국 G<sub>2</sub>기에 복구가 효과적으로 일어나지 않으므로 AT가 방사선에 과민 반응을 보이는 것 같다고 제시하였다. 그러나 연구 방법론에 있어서 방사선 조사 직후에 democolchicine을 세포에 투여하였으며 이것은 현재 중기에 있는 세포가 중기에서 벗어나도록 어느 정도 시간을 허용하여야 한다는 사실을 고려하지 않은 방법이다. 즉 그들이 관찰한 세포는 G<sub>2</sub>기가 아니라 중기 세포였을 것이며 중기 세포는 자신이 받은 손상을 다음 분열에 이르러서야 표현하게 되므로 실제의 염색체 손상 수준은 그들이 관찰한 값보다 더 높았을 것이다.

AT의 방사선 과민성에 대한 분자 생물학적인 연구가 아직 미흡한 이 시점에서 세포 생물학적인 접근만으로 논하기는 많은 어려움이 있다. 결국 AT 세포의 과민성을 염색체 손상 측면에서 설명하고 한다면 최초 손상과 이로부터 복구되어져 가는 역동적 양상에 대한 지식이 필수적일 것이다. 분열 중기 염색체 검사법은 암에 이환되기 쉬운 개체의 판별<sup>30)</sup>, 변이 유발 인자에 대한 감수성 검사<sup>17)</sup>나 최근에 이르러 중앙 세포의 방사선 감수성 검사<sup>31)</sup>에 애용되는 것으로서 정확성이 높고, 신속하고, 비교적 간단하며 세포를 단기 배양해서도 시행할 수 있는 유용한 방법이다. 그러나 기술적인 문제로써 분열 억제제인 colcemid와 약 한시간 정도 반응시키고 고정하므로 염색체의 손상이 어느 정도 복구된 후의 값만을 알 수 있을 뿐, 최초 손상을 정확히 측정하는 것에는 제한점이 있다. 이 때문에 Bender 등<sup>32)</sup>, Scott<sup>33)</sup>는 이 검사의 재현성에 의구심을 제기한 바도 있다.

본 연구에서 최초 손상을 알기 위한 수단으로 사용한 F-ara-A의 주요 작용은 DNA 합성의 억제이다. 이 약제는 세포 내로 용이하게 흡수되며 F-ara-ATP (5-triphosphate)로 전환되어 여러 약리 작용을 나타내게 된다<sup>16,34,35)</sup>. 약제의 농도를 결정하기 위하여 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M로 농도를 달리하여 시행한 예비 실험에서 100  $\mu$ M 이상이면 손상 복구의 억제 효과가 비슷하였으므로 100  $\mu$ M을 택하였고, 세포 내로 용이하게 흡수되기 때문에 F-ara-ATP를 세포내에 충분히 축적하기 위하여는 방사선 조사 30분 전이면 충분한 것으로 나타났다. F-ara-ATP는 세포내에서 DNA와 RNA 모두에 결합하여 핵산 합성 과정을 억제하는 작용을 하는데 특히 DNA의 3'terminal에 F-ara-AMP (5-monophosphate)의 형태로 결합하여 더 이상 DNA 사슬의 연장이 못일어나게 하는 종결자 역할을 하게 된다<sup>16,34,35)</sup>. 또한 F-ara-ATP는 세포질 내의 deoxyadenosine triphosphate (dATP)와 경쟁적으로 DNA에 반응하므로 dATP와 F-ara-ATP의 비율이 매우 중요한 요소가 된다<sup>35)</sup>. 따라서 본 연구에서는 세포 배양액을 72시간 동안 투석시켜서 배양액 내의 핵산염을 제거시킨 후 사용하여 F-ara-ATP의 효과를 최대한으로 하고자 노력하였다. 실험 대상이었던 세포주 모두에서 방사선과 F-ara-A가 함께 투여된 실험군에서는 방사선 단독 투여군보다 염색체 손상의 손상 수준이 높고 어



는 시각에서나 같은 값의 염색체 손상을 보였다. 이것은 F-ara-A에 의해서 DNA 손상의 복구가 억제된 결과이므로 복구가 일어나지 않은 최초의 염색체 손상을 대표할 것이다.

AT의 방사선 과민성은 방사선에 의한 손상을 인식하고, 복구 과정을 개시하여 진행시키는데 결합이 있으며 주로 복구에 관여하는 효소에 이상이 있거나 결핍에 기인할 것이라는 개념이 보편적이다. 그러나 이를 뒷받침하는 근거는 아직 확실치 않다. 이러한 개념에 반박하여 복구 양상은 유사하나 최초 손상이 다르다는 본 연구 결과는 Bender 등<sup>9)</sup>, Mozdarani와 Bryant<sup>36)</sup>와 일치하고 있다. Mozdarani와 Bryant는 ara-A를 이용하여 최초 손상을 측정하였고 Bender 등은 방사선 조사 후 1.5시간 시점부터 일정 시간 간격으로 염색체 손상을 측정하여 복구 양상을 회귀 방정식으로 집약한 결과 AT와 정상인 세포 간에 기울기는 같고 Y축 절편만이 다르다고 하였다. 따라서 복구 양상은 유사하고 최초 손상이 다를 것으로 추정하였으나 그들은 최초 손상을 측정하지 못하였다.

흥미로운 것은 ATH가 염색체 손상 및 복구 양상에 있어서 정상인 세포와 거의 같은 양상을 취한다는 점이다. ATH는 표현형이 정상이어서 AT의 특징적인 증상을 갖고 있지 않으나 역시 암 발병율이 정상인에 비해서 현저히 높다는 점 때문에 ATH를 구별해 내기 위한 방법론에 대한 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. Parshad 등<sup>37)</sup>, Sanford 등<sup>29)</sup>은 ATH의 염색체 감수성이 정상인 보다 현저하게 높으므로 대상인의 말초 혈액 임파구에 중기 염색체 검사를 실시하자고 제안하였다. 그러나 Bender 등<sup>9)</sup>의 연구 결과 및 본 연구 결과에서 ATH가 정상인 세포와 같은 양상을 보이고 있다. 반면 세포 생존 곡선에서는 ATH와 정상인 세포 간에 생존율의 차이를 보이고 있으므로 방사선에 의한 염색체 손상 여부가 세포 생존여부로 표현하는 과정에서 어떤 차이가 있을 것을 가정할 수 있다. Steel 등<sup>21)</sup>이 제시한 대로 방사선을 세포에 조사 시 회복 가능한 손상과 회복 불가능한 손상이 있다면 ATH와 정상인 세포 간에 이 두가지 요소가 차이가 있을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 연구자마다 결과가 상이한 것은 연구 방법론의 차이에도 원인이 있을 수 있으나 ATH 자체가 다양한 이형성 집단을 내포하는 것에도 연관이 있을 것이다.

방사선 감수성을 표현하는 가장 보편적인 방법은 세

포 생존 곡선이라 할 수 있고 세포 생존 곡선의 여러 지표 가운데 SF2가 임상적 결과에 대한 예측도가 가장 높은 것으로 알려져 있다<sup>19,20,38,39)</sup>. 본 연구에서 SF2와 염색체의 최초 손상이 유의한 상관 관계를 보인 것은 두 가지 의미가 있다고 본다. 첫째는 세포마다 서로 다른 SF2값이 그 세포의 방사선 민감성을 대표한다면 이는 최초 손상의 차이에 기인할 것이며 즉, 최초 손상의 정도가 세포의 고유한 방사선 감수성의 근본 원인으로 생각할 수 있다는 점이고 둘째는 방사선 치료시에 대상 환자의 고유의 방사선 감수성을 알기 위하여 중기 염색체 검사의 효용성을 고려해볼 수 있다는 점이다.

방사선 감수성은 임상적으로, 세포 생물학적으로, 또 분자 생물학적으로 여러 측면에서 접근하여 설명할 수 있다. DNA 손상의 100%가 염색체 손상으로 표현되는가에 대해서는 이견이 많으며<sup>14,40)</sup> 이 분야에 대하여 더욱 심도있는 연구가 필요하다. 본 연구는 방사선 감수성을 염색체 감수성 측면에서 논한 것으로서 G<sub>2</sub> 염색체의 손상 및 복구의 양상을 이해하는 데에 보다 더 접근하고자 하였다.

## 결 론

방사선 감수성이 높은 AT와 ATH 및 정상인에서 유래된 임파양 세포주를 연구 대상으로 하여 방사선 감수성의 차이를 염색체의 방사선 감수성 측면으로 접근하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) F-ara-A를 이용해서 염색체 손상의 복구를 효과적으로 억제할 수 있었고 이로 인해 방사선에 의한 염색체의 최초 손상을 측정할 수 있었다.
- 2) 방사선에 의한 염색체의 최초 손상은 AT에서 가장 높았고 ATH와 정상인 세포주는 비슷한 수준이었다.
- 3) 염색체 손상의 역동적인 복구 양상은 AT, ATH, 정상인 세포주 모두 유사하였다.
- 4) 방사선 생존 곡선에서 AT가 가장 민감하고 그 다음 ATH, 정상인 세포주의 순이었으며 방사선 생존 곡선의 지표로서 SF2는 염색체의 최초 손상과 유의한 상관 관계를 보였다.

이상을 종합하여 보면 AT, ATH 및 정상인의 임파양 세포주의 방사선 감수성의 차이는 염색체 감수성의 측면에서 볼 때 복구 양상의 차이 보다는 방사선으로 유

도되는 최초 손상의 정도의 차이에 의한 것이며 이것이 궁극적으로 방사선에 의한 세포 생존율 차이의 주요한 원인으로 생각된다.

## REFERENCES

1. **Peters LJ**: Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response. *Radiother Oncol* 17:177-190, 1990
2. **Weichselbaum RR, Ebstein J, Little JB**: *In vitro* radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from patients with unusual clinical response to radiation. *Radiology* 121:479-482, 1976
3. **Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD**: Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6:1573-1575, 1980
4. **Woods WG, Byrne TD, Kim TH**: Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer* 62:2341-2345, 1988
5. **Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB**: *In vitro* radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusual clinical response to definitive radiation therapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 121:227-231, 1990
6. **Peters LJ**: Significance of genetic variability in radiosensitivity in clinical radiotherapy. *J Jpn Soc Ther Radiol Oncol* 2:247-253, 1990b
7. **Gatti RA, Swift W**: Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a Degenerative Disease of Childhood. New York, Alan R. Liss, 1985, pp 15-48
8. **Natarajan AT, Meyers M**: Chromosome radiosensitivity of ataxia telangiectasia cells at different cell cycle stages. *Human Genet* 52:127-132, 1979
9. **Bender MA, Rary JM, Kale RP**: G<sub>2</sub> chromosomal radioactivity in ataxia-telangiectasia lymphocytes. *Mutat Res* 152:39-47, 1985
10. **Lehman AR, Jaspers NGJ, Gatti RA**: *The Fourth International Workshop on Ataxia-telangiectasia*. *Cancer* 49:6162-6163, 1989
11. **Iliakis G, Pantelias G, Seaner R**: Effect of arabinofuranosyladenine on radiation induced chromosome damage in plateau-phase CHO-cells measured by premature chromosome condensation: Implication for repair and fixation of PLD. *Rad Res* 114:361-378, 1988
12. **Iliakis G, Pantelias G, Okayasu R, Seaner R**: Comparative studies on repair inhibition by ara A, ara C, and aphidicolin of radiation induced DNA and chromosome damage in rodent cells: Comparison with fixation of PLD. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16:1261-1265, 1989
13. **Mozdarani H, Bryant PE**: Cytogenetic response of normal human and ataxia telangiectasia G<sub>2</sub> cells exposed to X-rays and ara-C. *Mutat Res* 226:223-228, 1989
14. **Pandita TK, Hittleman WN**: The contribution of DNA and chromosome repair deficiencies to the radiosensitivity of ataxia-telangiectasia. *Rad Res* 131:214-223, 1992
15. **Brockman RW, Schabel FM Jr, Montgomery JA**: Biologic activity of 9-β-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine, a metabolically stable analog of 9-β-D-arabinofuranosyl-adenine. *Biochem Pharmacol* 26:2193-2196, 1977
16. **Plunkett W, Chubb S, Alexander L, Montgomery JA**: Comparison of the toxicity and metabolism of 9-β-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9-β-D-arabinofuranosyl adenine in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res* 40:2349-2355, 1980
17. **Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM, Ramkisson D, Schantz SP, Jessup JM, Winn RJ, Shirley L, Furlong C**: Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer* 43:403-409, 1989
18. **Chantham Barrs Inn Workshop Conference**: Karyological monitoring of normal cell populations. *Intern Ass Biol Stand* 2-17, 1971
19. **Fertil B, Malaise EP**: Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7:621-629, 1981
20. **Fertil B, Malaise EP**: Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11:1699-1707, 1985
21. **Steel GG, Deacon JM, Duchesne GM, Horwich A, Kelland LR, Peacock JH**: The dose-rate effect in human tumor cells. *Radiother Oncol* 9:299-310, 1987
22. **Higurachi M, Conen PE**: *In vitro* chromosomal

- radiosensitivity in 'chromosomal breakage syndromes'. *Cancer* 32:380-383, 1973
23. **Rary JM, Bender MA, Kelly TE:** Cytogenetic studies of ataxiatelangiectasia. *Am J Human Genet* 26:70-76, 1974
  24. **Bates PR, Lavin MF:** Comparison of  $\gamma$ -radiation-induced accumulation of ataxia-telangiectasia and control cells in  $G_2$ -phase. *Mutat Res* 218:165-170, 1989
  25. **Zampetti-Bossler F, Scott D:** Cell death, chromosome damage, and mitotic delay in normal human ataxia-telangiectasia and retinoblastoma fibroblasts after X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 38:547-558, 1981
  26. **Painter RB, Young BR:** Radiosensitivity in ataxia telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 77:7315-7317, 1980
  27. **Ford MD, Martin L, Lavin MF:** The effect of ionizing radiation on cell cycle progression in ataxia-telangiectasia. *Mutat Res* 125:115-122, 1984
  28. **Tatsuka M, Nikaido O, Tatsumi K, Takabe H:** X-ray-induced  $G_2$  arrest in ataxia-telangiectasia lymphoid cells. *Mutat Res* 214:321-328, 1989
  29. **Sanford KK, Parshad R, Price FM, Jones GM, Tarone RE, Eierman L, Hale P, Waldman TA:** Enhanced chromatid damage in blood lymphocytes after  $G_2$  phase X-irradiation, a marker of the ataxia-telangiectasia gene. *J Natl Cancer Inst*, 82:1050-1054, 1990
  30. **Parshad R, Sanford KK, Jones GM:** Chromatid damage after  $G_2$  phase X-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80:5612-5616, 1983
  31. **Schwarz JL:** The radiosensitivity of the chromosomes of the cells of human squamous cell carcinoma cell lines. *Rad Res* 129:96-101, 1990
  32. **Bender MA, Viola MV, Fiore J, Thomson MH, Leonard RC:** Normal  $G_2$  chromosomal activity and cell survival in the cancer family syndrome. *Cancer Res* 48:2579-2584, 1988
  33. **Scott D:** The 25th Paterson Symposium-Is There a Future for Radiosensitivity Testing? *Br J Cancer* 64:197-199, 1992
  34. **Plunkett W, Huang P, Gandhi V:** Metabolism and Action of Fludarabine Phosphate. *Seminars Oncol* 17 (Suppl):3-17, 1990
  35. **Huang P, Chubb S, Plunkett W:** Termination of DNA synthesis by 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoro adenine. *J Biol Chem* 265:16617-16625, 1990
  36. **Mozdarani H, Bryant PE:** Kinetics of chromatid aberrations in  $G_2$  ataxia-telangiectasia cells exposed to X-rays and ara-A. *Int J Radiat Biol* 55:71-74, 1989b
  37. **Parshad R, Sanford KK, Jones GM, Tarone RE:**  $G_2$  chromosomal radiosensitivity of ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Cancer Genet Cytogenet* 14:163-168, 1985
  38. **Deacon J, Peckham MJ, Steel GG:** The radiosensitiveness of human tumors and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 2:317-323, 1984
  39. **Peters LJ, Brock WA, Chapman JD, Wilson G:** Predictive assays of tumor radiocurability. *Am J Clin Oncol (CCT)* 11:275-287, 1988
  40. **Hittleman WN, Pollard M:** A comparison of the DNA and Chromosome repair kinetics after  $\gamma$  irradiation. *Rad Res* 92:497-509, 1982