

HeLa.S3(SC) 세포계의 집락형성에 미치는 방사선의 효과

영남대학교 의과대학 치료방사선과학교실

신세원 · 김성규 · 김명세

서 론

오늘날 세포 배양 (Cell culture) 기술의 발달에 힘입어 단세포 현탁액 (Single cell suspension)의 조제가 가능하게 되었으며, 필요에 따라 다양한 농도로 희석시켜 일정한 배양조건으로 장기간 배양하면서 여러가지 실험이 가능하게 되었다.

그 결과 새로이 개발된 항암제의 효능 시험이나 방사선치료에 연관된 시험관내 (*in vitro*) 실험 모형에 광범하게 이용되고 있으며, 생체내 (*in vivo*) 실험 모형과 더불어 방사선 생물학적인 연구에 가장 기본적이며 중요한 부분을 차지하고 있다.

방사선 생물학적인 관점에서 살아 있는 세포는 자기 스스로 번식하여 육안적으로 판별 가능한 크기의 집락 (Colony)을 형성할 수 있어야 하며 세포사망 (Cell death)은 이러한 증식능 (Reproductive integrity)의 상실을 의미한다.

일반적으로 방사선 치료가 효력을 나타내려면 피폭받은 세포는 스스로 증식할 수 없

으며 성장이나 전파가 불가능하여야 한다.

이러한 방사선 치료의 효과는 주어진 방사선량과 피폭받은 세포의 증식능 사이에 함수관계로 나타낼 수 있고, 통상 선량-세포 생존곡선 (Dose-survival curve)으로 기술되며 대상세포의 종류, 방사선의 종류 및 선질, 조사량, 조사방식, 병합치료여부, 조사 당시의 산소상태 및 조사 후 배양 조건 등에 따라 다양하게 나타날 수 있다.

본 연구의 목적은 확립된 세포주를 조사 (照射) 대상으로 방사선치료에서 생물학적인 효과비 산출에 기준이 되는 orthovoltage 실험용 치료기를 이용하여 집락 (Colony)형성에 미치는 방사선의 영향을 관찰하여 향후 다양한 조사조건에 따른 실험적 연구에 참고 자료로 이용하고자 시행되었으며 그 결과를 문헌고찰과 함께 보고한다.

재료 및 방법

대상 세포주

본 연구에 이용된 세포주는 일본 Tsukuba

본 연구는 1993년도 영남대학교 임상의학연구소의 연구비 보조로 이루어졌음.

소재 이화학연구소 유전자은행내 세포은행 (RIKEN, Gene Bank, Cell Bank)에서 분양 받은 HeLa.S3(SC)세포주로서, 사람의 자궁 경부선암에서 유래한 확립된 세포주이다.

PBS(-). 0.02% EDTA 용액조제

0.02 gm의 EDTA·2Na 분말을 90 ml의 증류수에 녹여 5분간 자석식 진탕기 (Magnetic Stirrer)로 균일하게 용해시킨 후 10 ml의 PBS (-)x10 용액을 첨가하여 고무 섞은 다음 0.22 μ m의 무균여과지를 통과시켜 제조하였다.

단세포 현탁액 조제 및 방사선 조사

먼저 HeLa.S3(SC) 배양접시의 배양액을 제거하고 PBS(-)·0.02% EDTA 용액으로 한번 씻은 후 0.05%의 trypsin용액으로 처리하였으며, 10% 되게 송아지 혈청을 첨가한 MEM (Nissui Co.)배양액을 사용하여 단세포 용액을 만들었다.

이때 전체 세포의 90% 이상이 단 세포 상태를 유지하도록 현미경으로 확인하면서 pipetting 하여야 한다. 이 경우 Pasteur pipette은 끝이 둥근 것을 사용하여야 pipetting으로 인한 세포의 손상을 피할 수 있다.

90% 이상이 단세포 상태가 되었을 때 혈구계산기 (Hemocytometer, Tadai type)를 이용하여 세포수를 환산한 다음 60 mm 배양 접시에 1 ml당 500개의 세포가 포함되게 5 ml씩 8개 (4개 : 대조군, 4개 100 cGy 조사군), 1 ml당 1000개의 세포가 포함되게 4개 (200 cGy 조사군), 1 ml당 2000개의 세포가 포함되게 4개 (400 cGy, 조사군), 및 1 ml당 5000개의 세포가 포함되게 4개 (600 cGy 조사군) 모두 20개의 배양접시 (Culture dish)를 준비하였다.

방사선조사에 이용된 기계는 Hitachi사 제품인 MBR-1520 R으로서 150 kVP, 15 mA, (0.5 mm AL+0.2 mm Cu) Filter를 통한 x-선으로서 초점과 피사체간 거리는 350 mm 를 유지하였으며 10초간 1회전하는 조사대에서 분당 100 cGy의 선량율로 조사를 하였다.

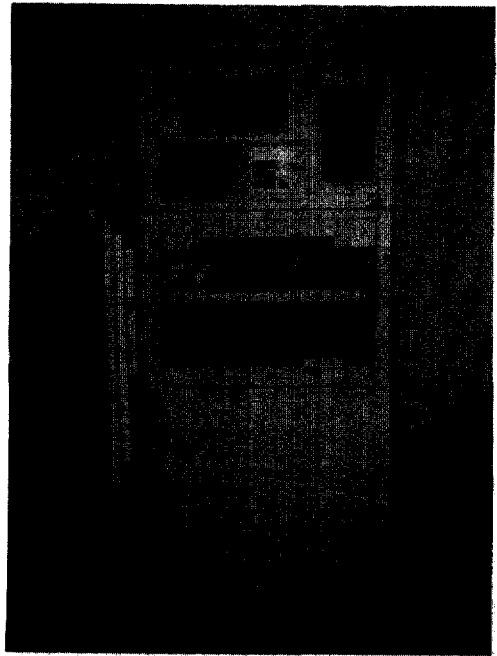


Fig. 1. Radiation machine, MBR-1520R (Hitachi Co.).

조사의 정확성을 기하기 위하여 조사전에 전리함을 이용하여 출력을 측정하였으며 3회 측정하여 평균치를 환산하여 출력으로 간주 하였다.

방사선조사가 끝난후 5% 탄산가스 배양기에 2주일간 배양 후 염색하여 집락의 숫자를 계산하여 집락형성능 (plating efficiency), 평균집락의 수 (Colony count) 및 생존분획 (Surviving fraction)을 산출하였다.

성 직

방사선조사를 실시하지 않았던 4개의 배양 접시에서 각각 194, 226, 235, 및 273개의 집락을 보여 평균 232개로 집락형성능 (plating efficiency)은 0.464 이었다.

100 cGy 조사군에서는 각각 163, 170, 190, 및 230개의 집락을 보여 평균 188개이었으며

생존분획 (Surviving fraction)은 0.81 이었다.

200 cGy 조사군에서는 각각 136, 139, 144, 및 148개의 집락을 보여 평균 142개 이었으며 생존분획은 0.306 이었다.

400 cGy 조사군에서는 각각 105, 110, 132, 및 154개의 집락을 보여 평균 125개 이었으며 생존분획은 0.1346 이었다.

600 cGy 조사군에서는 각각 80, 82, 85 및 94개의 집락을 보여 평균 85개 이었으며 생존분획은 0.0366 이었다.

Semilog로 세포 생존곡선을 그린 결과 다 표적 1 hit (Multi-target plus single hit) 형태를 보여 주었다(그림 2).

세포 생존곡선으로 얻어진 D_0 는 150 cGy, D_q 는 80 cGy, 외삽치 (Exponential number) 는 1.7이었다.

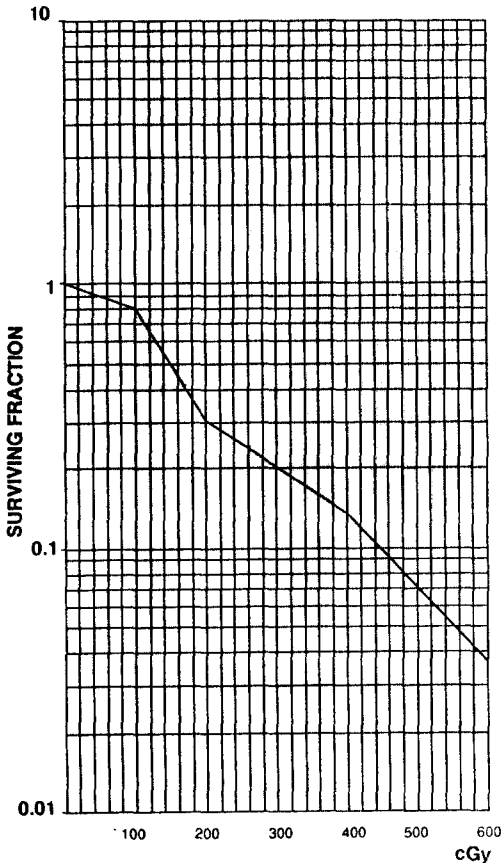


Fig. 2. Surviving fraction of HaLa.S3(SC).

고 찰

방사선치료는 이온화 방사선 (Ionizing radiation)을 이용하여 악성종양 (Malignant tumor) 환자를 치료하는 임상의학의 한 분야로서¹⁾ 전체 악성종양 환자의 약 70%는 치료과정중에 한 번이상 방사선치료를 받고 있는 실정이다²⁾.

방사선 치료의 선택적 치료효과(Selective effect)는 정상 조직에는 최소한의 손상을 주면서 종양조직에는 최대한의 방사선을 조사하여 성장을 중단시킬 수 있어야 이상적인 치료효과를 기대할 수가 있다³⁾.

* D_0 : Mean lethal dose
 D_q : quasithreshold dose

이러한 방사선치료의 효과를 검증하기 위해선 임상적인 방사선치료와 직결된 방사선 생물학적인 연구 (Radiobiological research)가 중요하며 방사선량과 세포의 생존율과의 연관성에 관한 연구⁴⁾와 최근에는 분자생물학 (Molecular biology)적인 연구도⁵⁾있으나 보편화되지는 못하고 있다.

세포에 일시적으로 대량 (수천 cGy)의 방사선이 조사되면 세포의 각종 대사활동이 완전히 억제되어 급격한 세포사망이 초래되는데 이를 비분열사 (Non-mitotic death) 또는 간기사 (Interphase death)라고 부르며⁶⁾ 방사선 생물학적인 관점에서는 큰 의미가 없다.

그러나 임상적으로 사용되는 100-200 cGy 정도의 저선량에서는 세포가 끝없이 분열해 나갈 수 있는 능력이 억제가 되어 세포가 형태적으로나 생화학적으로 정상상태로 남아 있어도 조직의 재생능력이 감소하고 수회의 분열과정을 거친 뒤 세포가 사망하게 된다. 이를 분열사 (Mitotic death) 또는 증식사 (Reproductive death)라고 부르며 방사선치료의 효과를 평가하는데는 더 합당한 판단기준으로 이용 가능하다⁷⁾.

증식사의 정량적인 평가는 세포의 집락형성능 (Plating efficiency)의 측정으로 분석가능하며 포유동물 세포에 대한 방사선조사의 효과분석에 중요한 방사선 생물학적인 의의를 가지고 있다⁸⁾.

특히 세포의 생존을 분석하는 방법중에 가장 널리 쓰이는 것은 분리된 상태의 단세포가 집락 (colony)을 이룰 수 있는 능력의 측정으로서 단세포 현탁액 (single cell suspension)의 단순 회석법으로 가능하다⁹⁾.

육안적으로 확인되는 집락은 최소한 16-50

개의 세포가 모여야 되고 4-6번의 분열을 거쳐야 한다¹⁰⁾.

통상 확립된 세포주를 사용하는데 본 연구에 사용된 HeLa.S3(SC)세포주는 사람의 자궁경부 선암세포에서 유래하였으며¹¹⁾, 시험관내 생존을 검사에 흔히 쓰이고 세포주기가 24시간이어서¹²⁾ 10-14일 배양 후 집락형성을 평가가 용이하다.

일반적으로 포유동물세포의 세포생존곡선은 multi-event생존곡선의 형태를 취한다고 알려져 있으며¹³⁾ 세포생존곡선의 형태에 관한 연구는 정량적 방사선 생물학의 필수적인 목적이 되며 200-300 cGy로 4-6주간 치료를 시행하는 통상적인 방사선치료에서 저선량에 대한 방사선 장애방어에 직접 연관되기에 임상적으로 중요하다¹⁴⁾.

본 연구에서 얻어진 집락 형성능은 0.464로서 포유동물세포의 0.5-0.8에 근접하며¹⁰⁾ 세포 생존곡선의 형태는 다표적 1 hit (multi-target plus single hit)형태로 일반적인 포유동물세포의 생존곡선을 보였으며 이 곡선의 형태를 좌우하는 변수 (parameter)인 Do는 150 cGy, Dq는 80 cGy, 외삽치 (extrapolation number)는 1.7으로서 산소화가 잘된 포유동물세포가 x-선이나 gamma-선에 급성 피폭시 보이는 범위^{13,14)}안에 속함을 확인하였으므로 향후 다양한 실험의 참고자료로 이용할 수 있으리라 사료된다.

요 약

임상적으로 많이 이용되는 범위의 방사선 조사에서는 증식능의 상실을 세포사망으로

정의를 내린다.

본 연구는 실험용 orthovoltage조사기틀 이
용하여 확립된 세포주인 HeLa.S3(SC)를 대상
으로 각각 100 cGy, 200 cGy, 400 cGy 및
600 cGy 방사선조사 후 2주일간 배양후 crystal
violet 염색을 하여 육안적으로 판별가능한
크기의 집락의 수를 산출하여 다음의 결과를
얻었다.

HeLa.S3(SC)세포의 집락 형성능은 0.464이
었다.

세포의 생존곡선의 형태는 대표적, 1 hit
형태를 보였다.

Do는 150 cGy, Dq는 80 cGy, 외삽치는 1.7
이었다.

이 연구결과는 향후 다양한 방사선 생물학
연구에 참고자료로 이용 가능하리라 사료된
다.

참고문헌

- Perez CA, Brady LW : Principles and practice of radiation oncology. 2nd ed, J.B.Lippincott Co, Philadelphia, 1993, p 1.
- Farmer PB, Walker JM : The molecular basis of cancer, John Wiley and sons, Inc, New York, 1985, p 239.
- Moss WT, Cox JD : Radiation oncology : Rationale, technique, results. 6th ed, The C.V.Mosby Co, St. Louis, 1989, p 12.
- Halnan KE : Treatment of cancer, Chapman and Hall Ltd, Cambridge, 1989, p 37.
- Ruddon RW : Cancer biology, Oxford university press, New York, 1989, pp 507-517.
- Tannock IF, Hill RP : The basic science of oncology. 2nd ed, McGraw-Hill, Inc, New York, 1992, pp 262-264.
- Hall EJ : Radiobiology for the radiologist. 3rd ed, J.B.Lippincott Co, Philadelphia, 1988, pp 18-20.
- Moossa AR, Robson MC, Schimpff SC : Comprehensive textbook of oncology. William and Wilkins, Baltimore, 1986, p 258.
- Freshney RI : Animal cell culture : A practical approach. IRL press. Ltd, Glasgow, 1986, p 200.
- Freshney RI : Culture of animal cells : A manual of basic technique.. 2nd ed, Alan R.Liss, Inc, New York, 1987, p 241.
- Grey GO, Coffman WD, Kubicek MT : Tissue culture capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer research 12 : 264-265, 1952.
- Hall EJ : Radiobiology for the radiologist. 3rd ed, J.B.Lippincott Co, Philadelphia, 1988, p 95.
- Fletcher GH : Testbook of radiotherapy. 3rd ed, Lea and Febiger, Philadelphia, 1980, pp 107-110.
- Coggle JE : Biological effects of radiation. 2nd ed, Taylor and Francis Ltd, London, 1983, pp 56-59.

- Abstract -

Radition Effect on Colony Formation
of HeLa.S3(SC) Cell Line

Sei One Shin, Sung Kyu Kim, Myung Se Kim

*Department of Therapeutic Radiology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Since discovery of X-rays, radiotherapy has evolved into one of the most scientific branches of medicine and has established its role as the primary line or the secondary line of attack, after surgery, in the treatment of malignant cancers.

Nowadays its importance is illustrated by the fact that as many as 70 per cent of all patients with cancer will receive radiation therapy at sometime during their disease process.

Biologic effects of X-rays began to be apparent soon after the discovery by Roentgen in 1895.

In clinical radiotherapy, the biologic endpoint of most importance is loss of cellular reproductive ability or clonogenicity.

One of the commonest ways to assess cell survival is to use an *in vitro* plating assay.

We analyzed radiation effect on colony formation of HeLa.S3(SC) cell line and obtained results are as follows :

The plating efficiency is 0.464.

The shape of cell survival curve is similar to multi-target plus single hit component model.

Estimated values of D_0 , D_q , and extrapolation number are 150 cGy, 80 cGy and 1.7 respectively.

We reported these experimental data with review of literature.

Key Words : Radiation effect, Cell survival curve, HeLa.S3(SC) cell line