

저선량 방사선 조사가 배양 세포에 미치는 효과

군산전문대학 방사선과 · 군산대학교 자연과학대학 화학과*

이송재 · 장재철*

The Effects of MDCK Cell on Low Dose Irradiation

Song Jae Lee · Jae Chul Chang*

Dept. of Radiology, KunSan College

Dept. of Chemistry, College of Natural Science, Kunsan National University

The present study was undertaken to investigate the effects of cultured MDCK cell line on the cell viability and the activities of superoxide dismutase(SOD), catalase, change of FOX 1 with low dose radiation. When MDCK cells were irradiated low dose (less than 50 cGy), the cell viability remains high after 2 hrs, but few changes after 24 hrs. In the low dose irradiated MDCK cells, the activities of SOD and catalase were increased with compared to control group and high dose. But the content of H₂O₂(FOX 1) was decreased. These results suggest that the cultured MDCK cells probably were induced expression of defense mechanism.

I. 서 론

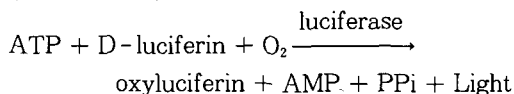
생체조직이 방사선 에너지를 흡수하면 조직의 구성분자의 여기, 전리작용에 의해 개시되는 물리 화학적 단계에서 수소원자($\cdot H$), 수산화전자(e^-_{aq}), 그리고 hydroxyl radical($\cdot OH$)과 같은 1차 유리기들이 형성된다. 생체조직에 고선량의 방사선 조사로 유리기의 생성 증가는 생체내 항산화 효소의 활성 저하나 glutathione 등의 항산화제 함량 감소를 일으키므로서 지질 과산화 반응이 촉진된다.^{1~5)}

이같은 반응을 통하여 방사선이 생물체에 조사되면 조직이나 기관의 위축 또는 기능적 변화로 인한 세포의 치사 및 세포내의 표적분자

인 DNA 구성 성분에 손상을 주므로 유전적 장애 등이 나타난다.^{6,7)} 고선량 방사선 조사후의 생물체에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 이루어져 있지만, 저선량의 방사선이 과연 생물체에 어떠한 영향을 미치는가는 아직도 많은 연구가 이루어지고 있으며^{8~10)} 또한 논란의 대상¹¹⁾이 되고 있는 실정이다.

세포의 증식능과 독성을 측정하기 위해 Clonogenic forming assay 방법과 방사성 동위원소를 이용한 Radio immuno assay(RIA) 방법과 함께 ATP(Adenosine triphosphate) 측정법이 이용되고 있다. 최근들어 ATP^{12~16)}법을 이용한 luciferin-luciferase bioluminescence 측정법이 감도 때문에 가장 널리 사용되고 있으

며(Higashi et al., 1985; Stanley, 1986) 측정 방법¹³⁾은 다음과 같다.



이에 본 연구에서는 MDCK세포를 배양하여 저선량의 gamma선을 조사한 후 ATP 방법을 이용하여 세포의 증식능의 변화를 측정하고, 세포내에서의 효소 활성도 변화(SOD, catalase)를 측정하여 저선량 방사선 조사가 세포에 미치는 효과를 검토하여 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. MDCK세포배양

세포배양에 사용된 배지는 Iso Dulbeco's modified Eagle's medium(IDME, Sigma)이었으며, 10% Fetal bovine serum(FBS, Sigma), PC-ST 500X(20 g/ml)등을 첨가하여 사용하였다.

한국 세포주 은행으로부터 분주받은 MDCK cell을 25cm² flask(Nunc)에 접종하여 CO₂ incubator(5% CO₂ - 95% air, 37°C)에서 배양하였다.

2. 계대배양

배양 3일째에 배양용기에 들어있는 배양액을 버리고 신선한 배양액을 교환해준다. 배양 5일째에 배양용기 속에 들어있는 배양액을 버리고 Dulbeco's PBS로 세포 표면을 세척한 후 0.25% trypsin 0.5ml을 넣고 15분간 37°C에 보존한다. 신선한 배양액을 첨가하여 세포의 농도를 5 × 10⁴ cells/ml 밀도로 희석하여 세포배양 용기에 접종하여 계대배양을 실시하였다.

3. 방사선 조사

계대배양중인 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여 세포 부유액을 만들었다. 세포밀도를 3

× 10⁴ cells/ml로 하여 24 well 배양용기에 3개씩 나누어 분주하여 24시간 CO₂ incubator속에 배양한 후 cell viability를 측정하였으며, SOD, Catalase, FOX 1 등의 측정을 위해서 100 cm² petridish(NUNC)에 5 × 10⁶ cells/ml로 2일 배양하여 측정 하였다. 방사선 조사는 ⁶⁰Co gamma선원을 이용하여 10 × 10 cm 조사야에서 방사선원과 배양용기와의 거리가 120 cm되게 하였고, 이때 방사선 조사율(Dose rate)은 5.19 cGy/min이었다.

4. Cell viability

측정 선량별로 방사선을 조사하여 2시간, 24시간 후의 24 well속의 세포수의 변화를 ATP (Adenosine triphosphate) bioluminescence을 이용¹³⁾하여 측정하였다. ATP bioluminescence 시약은 Bio-Orbit Oy로부터 0.1 M Tris acetate, 2mM EDTA buffer pH 7.75와 luciferin-luciferase 등의 시약을 공급받았다. 세포가 들어 있는 well속에 TCA 1ml씩을 20분 동안 처리하고, 이중 상층액 200 l와 Tris-buffer 200 μl을 잘 혼합한다. 이혼합액 중 100 μl를 96 well microtitre tissue culture plate에 넣어 luminometer에 37°C로 5분간 안정화 시킨 후 20 μl의 luciferin-luciferase를 첨가한 후 바로 RLUs(relative light units)를 측정한다.

5. Superoxide dismutase 활성도 측정

SOD활성도는 Elstner 등의 방법을 변형하여 측정하였다.²⁰⁾ 즉, 65 mM phosphate buffer(pH 7.8) 1 ml와 증류수 0.1 ml 그리고 10 mM Hydroxy-lamine hydrochloride 0.1 ml 및 15 mM xan-thine oxidase 0.3 ml(60 μg enzyme)을 가한 후 25°C에서 20분간 반응 시킨 다음 1% (W/V) Sul-fanilamide용액 0.5 ml을 혼합 시킨 후 0.02% (W/V) naphthylethylen dia-mine 0.5 ml을 가하여 실온에서 20분간 방치한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하여 총 SOD값을

구하였으며 Mn-SOD 활성의 측정은 위 반응액 중 증류수 대신에 20 mM KCN 0.2 ml를 넣은 후 위와 같은 방법으로 측정하였다.

6. Catalase 활성도 측정

Catalase 활성도 측정은 Aebi 방법²¹⁾에 따라 50mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 희석시킨 측정시료 2.0 ml에 30 mM H₂O₂용액 1.0 ml를 넣은 후 20°C에서 240 nm 파장의 흡광도를 측정하였고 효소의 활성도는 1분 동안에 1 mol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1unit로 표시하였다.

7. FOX I recipe(water - soluble hydroperoxide)

25 mM H₂SO₄를 용매로 사용하여 100 uM Xylenol Orange, 250 uM Ammonium ferrous sulfate, 100 mM Sorbitol을 녹여서 FOX I reagent을 제조한다.

Sample 50 µl에 FOX I reagent 950 µl를 가한 다음 Vortex 후 30분간 방치한다. 그 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 UV-Spectrophotometer 560 µ에서 흡광도를 측정한다.

8. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 정량은 Lowry법²²⁾을 사용하였으며 실험 결과의 통계분석은 이원량 분석(Analysis of Variance ; ANOVA)을 사용하였다.

III. 실험결과

MDCK 세포 증식능의 변화

계대배양 중에 있는 MDCK 세포를 3 × 10⁴ cells/ml로 하여 24 well에서 1일 동안 배양한 후 10 cGy와 50 cGy의 저선량으로 방사선을 조사하였다. 방사선 조사 후 2시간과 24시간 경과 후의 세포 증식능을 조사한 결과 방사선 조

사 후 2시간에서 10 cGy는 95.1%, 50cGy는 96.4%로 대조군보다 약간의 감소가 나타났으며(Fig. 1), 24시간 후에서 10 cGy는 96.7%, 50 cGy는 73.1%로 선량이 증가함에 따라 세포 증식능의 변화가 관찰되었다(Fig. 2).

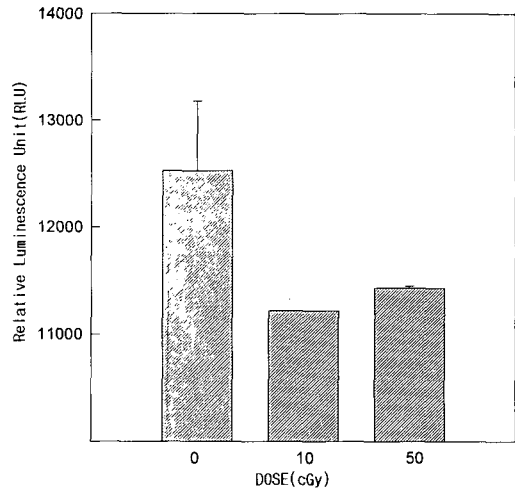


Fig. 1. Effect of MDCK cell viabilities at low γ -irradiated dose after 2hrs.

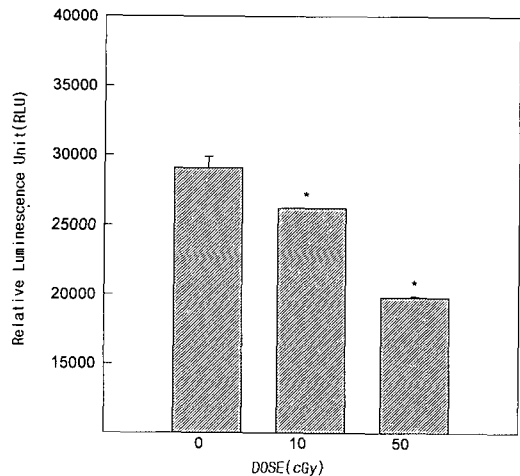


Fig. 2. Effect of MDCK cell viabilities at low γ -irradiated dose after 24hrs. * $p < 0.05$; Significantly different from gamma irradiated dose.

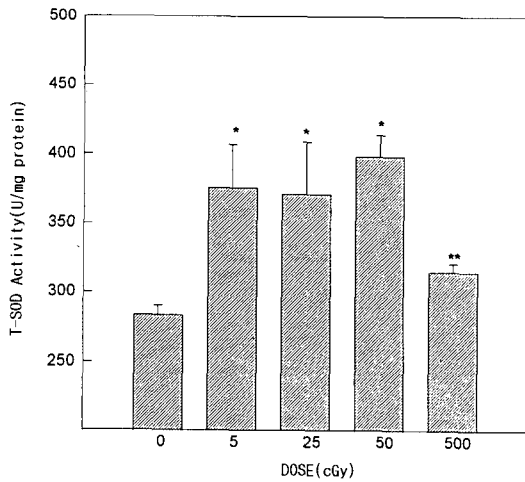


Fig. 3. Change of T-SOD activities in γ -irradiated MDCK cells. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$; Significantly different from γ -irradiated dose.

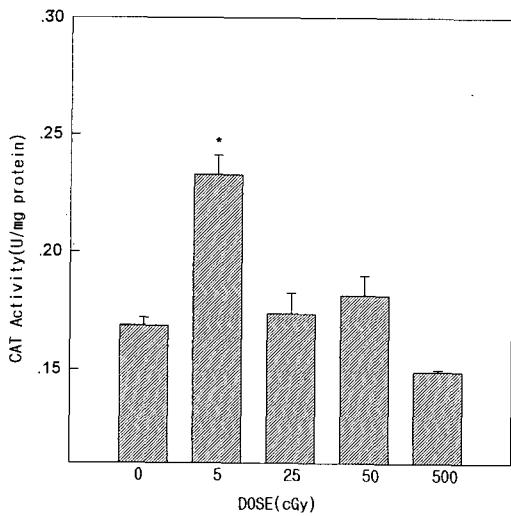


Fig. 4. Change of catalase activities in γ -irradiated MDCK cells. * $p < 0.05$; Significantly different from gamma irradiated

SOD 활성도의 변화

MDCK 세포를 100 cm² petridish에 5 × 10⁶ cells/ml로 2일 배양하여 ⁶⁰Co gamma선원을 이

용하여 방사선을 5c Gy, 25 cGy, 50 cGy, 500 cGy로 각각 조사하였다.

방사선 조사 후 4시간째에 세포를 모아 total SOD 활성도를 측정함 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 정상 대조군에서의 활성은 290.42 U/mg protein 였으며, 5 cGy, 25 cGy, 50 cGy의 저선량 방사선 조사에서 각각 406.55 U/mg protein, 408.85 U/mg protein, 413.96 U/mg protein으로 점진적인 활성의 증가($P < 0.05$)를 보였으나, 반면 500 cGy의 고선량 조사에 의한 활성도는 320.54 U/mg protein로 SOD의 활성도가 감소($P < 0.01$)하였다.

Catalase 활성의 변화

저선량 방사선 조사로 인한 MDCK세포 내 catalase의 활성도 변화를 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 정상 대조군의 활성은 0.172 U/mg protein이였으며, 5 cGy, 25 cGy, 50 cGy의 저선량 방사선 조사군에서 각각 0.241 U/mg protein, 0.173 U/mg protein, 0.175 U/mg protein으로 활성의 증가를 보였으며, 특히 5 cGy에서 유의성있는 증가를 보였고 반면 500 cGy의 고선량 조사에 의한 활성도는 0.15 U/mg protein로 Catalase의 활성도가 감소하였다.

세포 내의 수용성 H₂O₂의 변화(FOX I)

저선량 방사선 조사로 인한 MDCK세포 내 수용성 H₂O₂의 변화를 나타내었다. 정상 대조군은 0.739였으며, 5 cGy에서 0.712, 25 cGy에서 0.655, 50 cGy에서 0.602로 저선량 방사선 조사군에서 세포 내 수용성 H₂O₂의 양은 유의성 있게 감소한 반면, 500 cGy의 고선량 조사에 있어서는 0.750으로 수용성 H₂O₂의 양은 대조군에서 보다 증가하였다.

IV. 고 찰

전리방사선에 대한 생물학적인 반응의 연구는 고선량 조사 후 초기와 후기에 세포 치사와 관련된 점에 초점이 되었다. 그러나 저선량 조

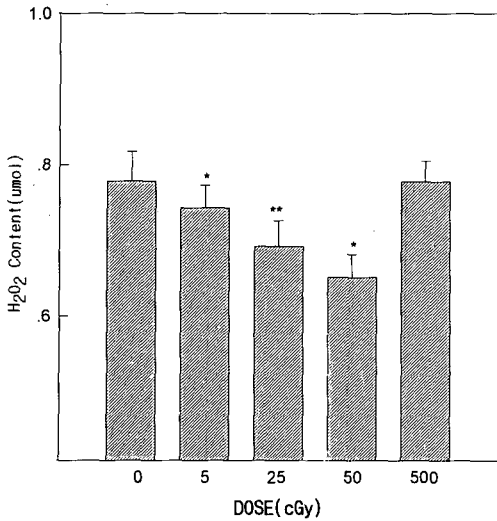


Fig. 5. Change of FOX I (H₂O₂ content) in γ -irradiated MDCK cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Significantly different from gamma irradiated dose.

사 후 세포와 분자적 반응은 상대적으로 최근에 연구가 활발하게 진행되고 있다.⁷⁻¹⁰ 세포의 핵이나 전체 세포의 내부에 방사선의 흡수는 전리방사선에 의해 확률론적으로 세포내 구조들과 상호 작용한다. 따라서 생화학적 기작에 의해서 세포내에 영향을 미치거나, DNA의 기능과 구조에 변화(6, 7)가 나타난다.

ATP bioluminescence 방법은¹²⁻¹⁶ 현재 사용 중에 있는 Clonogenic forming assay 방법과 방사성 동위원소를 이용한 Radio-immuno assay(RIA) 방법과 함께 세포 증식능의 측정 방법으로 많이 이용되고 있는 방법이다. 본 연구는 계대 배양 중인 MDCK세포에 저선량의 방사선을 조사한 후 ATP bioluminescence 방법을 이용하여 세포의 증식능을 조사한 결과 10 cGy 조사한 2시간에 있어서 대조군에 비하여 증식능의 변화 정도는 거의 발견되지 않았다. 이는 Prasad 등⁹의 연구에서 저선량의 방사선 조사는 세포의 증식능의 변화가 유도되지 않지만 유전자의 발현이 유도된다고 보고한 것

과 유사한 결과 생각된다.

Scott³ 동물체에서 이온화 방사선은 반응성이 강한 활성화된 산소종의 생성원인이 되며, 항산화 효소들은 이온화 방사선에 대한 생체의 저항성을 결정하는데 중요한 것이라 주장하였다. 이는 mammalian cell에 cystamine, 소량의 H₂O₂나 xanthine oxidase의 처리는 SOD 활성을 증가시켰으며¹⁷ 여러 조직에서 SOD 활성의 증가는 방사선에 대한 저항성을 증가시킨다는 보고^{18,19}들과 일치하는 것이다. Krizala¹⁹ 등은 흰쥐에 고선량(5~10 Gy)의 방사선을 조사시켰을 때 골수에서 SOD의 활성은 저하되었으나 골수 세포당 SOD 활성은 증가하였다고 보고하였다. 본 연구는 저선량(0.5 Gy 이하)의 방사선을 배양 중인 세포에 조사하여 SOD의 활성도를 관찰한 결과 SOD 활성이 대조군에 비해 증가 하였는데 이는 Yamaoka²⁰ 등이 흰쥐에 저선량(0.25 Gy)의 방사선 조사는 간에서의 SOD의 활성이 증가되었다고 보고한 것과 일치하였다.

또한, 저선량 방사선을 조사한 세포내에서의 catalase 활성도 증가되었는데 이는 SOD의 작용에 의해 생성된 H₂O₂를 분해하기 위해서 증가된 것으로 생각된다. 세포내의 수용성 H₂O₂의 양을 측정된 FOX I의 결과 저선량 부분에서 감소되었는데 이는 저선량에 의해 catalase 효소의 증가와 관련이 있는 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 배양된 세포에 저선량 방사선을 조사 시키면 실제 세포의 증식능에는 변화 없이 효소의 활성 변화가 유도되었는데 이는 아마 세포 내부의 자체적인 방어 기작의 발현이라 생각되지만, 과연 이같은 방어 기작이 어떠한 형태로 일어나는지를 분자적 수준에서 더 많은 연구가 이루어져야 될 것으로 사료된다.

V. 요 약

MDCK 세포를 한국 세포주 은행으로부터

분주 받아 배양한 후 저선량 gamma선 조사에 대한 세포수준에서 방사선 효과를 알아보기 위하여 세포 증식능의 변화, Superoxide dismutase(SOD)와 catalase, FOX I의 함량 변화를 측정 검토하였다. 그결과, 저선량의 방사선을 조사했을 때, 세포의 증식능은 방사선 조사후 2시간에서 10 cGy는 95.1%, 50 cGy는 96.4%로 대조군보다 약간의 감소가 나타났으나, 24시간 후에서 10 cGy는 96.7%, 50 cGy는 73.1%로 선량이 증가함에 따라 세포 증식능은 감소하였다.

저선량 조사에 의한 MDCK 세포의 SOD 활성도는 전반적으로 증가하였고, Mn-SOD 활성 역시 증가하였다. 세포 내의 H₂O₂의 양을 측정 한 FOX I에서 선량이 증가함에 따라 감소하였으며 catalase 효소의 함량은 대조군보다 증가되는 경향을 보였다.

이와 같은 결과로 볼 때 저선량 방사선 조사에 대한 효과는 세포내부의 자체적인 방어기작의 발현으로 인한 결과라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Marklund, S. L., Westman, N. G., Roos, G., and Carlsson, J. : Radiation resistance and the CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, Catalase, and Glutathione peroxidase activities of seven human cell lines. *Radiat. Res.* 1984 ; 100, 115-123
2. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986 ; 246, 501
3. Scott MD, Meshnick SR, and Eaton JW : Superoxide dismutase amplified organismal sensitivity to ionizing radiation. *J. Biochem.*, 1989 ; 264, 2498
4. Yamaoka, K., Edamatsu, R and Mori, A.

: Increased SOD activities and decreased lipid peroxide levels induced by low dose X irradiation in rat organs. *Free. Radic. Biol. Med.*, 1991 ; 11, 299

5. 박영순, 김동윤, 장재철 etc., 방치기학, 1992 ; 5, 142
6. Pandita TK., Hittleman WN., *Rad. Res.*, 1992 ; 131, 214
7. Ishii K., Misonoh K. : Induction of radio-adaptive response by low-dose X-irradiation on chromosome aberrations in human embryonic fibroblasts. *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR.* 1996 ; 28, 83
8. Feinendegen, LE., Bond VP., Booz J., and Muhlensiepen H. : Biochemical and cellular mechanisms of low-dose effects. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1988 ; 53, 23
9. Prasad AV., Mohan N., Chandrasekar B., and Meltz ML. : Induction of "immediate early genes" by Low-dose ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 1995 ; 143, 263
10. Liu SZ., Zhang YC., Mu Y., Su X., Liu JX. : Thymocyte apoptosis in response to low-dose radiation. *Mutat. Res.*, 1996 ; 358, 185
11. Pauwels E.K.J., K.E. van Wyngaarden. : Hormesis : are low doses of ionizing radiation harmful or beneficial? *Eur. J. Nucl. Med.*, 1995 ; 22, 481
12. S.P.M. Crouch, R. Kozlowski, K.J. Slater and J. Fletcher : The use of ATP, bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunological Methods.*, 1993 ; 160, 81
13. Koechli, O. R., Avner, B. P., Sevin, B. U., Avner, B., Perras, J.P., Robinson, D. S., and Averette, H. E. : Application of the adenosine triphosphate-cell viability testing : A report on the first results. *J. surg. onco.*, 1993 ; 54 : 119-125

14. Angioli, R., Sevin, B. U., Perras, J. P., Untch, M., Koechli, O. R., Nauyen, H. N., Steren, A., Schwade, J. G., Villani, C., and Averette, H. E. : In Vitro potentiation of radiation cytotoxicity by recombinant interferons in cervical cancer cell lines. *Cancer.*, 1993 ; 71 : No. 11, 3717
15. Garewal, H. S., Ahmann, F. R., Schiffman, R. B., and Celniker, A. : ATP assay : Ability to distinguish cytostatic from cytotoxic anticancer drug effects. *JNCI*, 1986 ; Vol. 77, No. 5, 1039
16. Gerhardt, R. T., Perras, J. P., Sevin, B—U., Petru, E., Ramos, R., Lucy Guerra, BS and Averette, H. E. : Characterization of in vitro chemosensitivity of perioperative human ovarian malignancies by adenosine triphosphate chemosensitivity assay. *Am J. Obstet. Gynecol.* 1991 ; 245
17. Laval, F. : Pre-treatment with oxygen species increases the resistance of mammalian cells to hydrogen peroxide and gamma rays. *Mutation. Res.*, 1988 ; 201, 73
18. Petkau, A. : Radiation protection by superoxide dismutase. *Photochem. Photobiol.*, 1978 ; 28, 276
19. Krizala, J., Stocklasova, A., Kovarova, H. and Ledvina, M. : The effect of gamma irradiation and cystamine on superoxide dismutase activity in the bone marrow and erythrocytes of rats. *Radiat. Res.*, 1982 ; 91, 507
20. Park YS., Kim YG., Chang JC, Kim DY. : *Kor. Biochem. J.*, 1993 ; 26(2), 184
21. Aebi HE., *Catalase. Insight : Methode of Enzymatic Analysis.* H. U. Bergmyer, ed 3rd ed. 1982 ; Vol. 3, 273
22. Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. and Randall, RJ. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. chem.*, 1951 ; 193, 265