

# 수종의 암세포주와 치은섬유아세포에서 방사선의 양과 분할조사에 따른 세포활성도와 독성의 변화에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실

이 삼 선 · 유 동 수

## 목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 연구방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 사진부도설명
- 사진부도
- 영문초록

## I. 서 론

방사선을 생체조직에 조사하면 일차적으로 물리적, 화학적 과정과 이차적으로 생화학적 과정을 거쳐서 생물학적 변화가 일어나게 되며 그 변화의 정도는 방사선의 양과 조사대상, 조사조건 등에 따라 다양하다. 그러나 그동안의 방사선에 의한 생체조직의 변화에 관한 연구는 주로 동물에 방사선을 조사한 후 나타나는 조직이나 장기의 구조와 기능 성장 및 세포소기관의 구조와 기

능 등의 변화를 관찰하여 왔다<sup>1-7)</sup>. 방사선생물학에 대한 연구는 얻어진 연구결과를 방사선치료에 적용시켜왔다<sup>5,6,7)</sup>. 그러나 최근에는 정상세포나 혹은 암세포를 배지에서 성장시키는 기술적인 방법의 발달과<sup>8,9)</sup> 함께 세포변화를 정량적으로 알 수 있는 방법들이 개발되어 기존에 추측해왔던 가설들이 세포학적 수준에서 연구되고 있어<sup>10-12)</sup> 인체세포에 대한 연구는 물론 동물세포와의 비교 연구도 가능하게 되었다<sup>13-16)</sup>.

인체는 방사선감수성의 정도가 다양한 세포와 조직으로 구성되어 있을 뿐만 아니라 여러 세포의 혼합효과로 인해 장기나 조직내의 세포관찰만으로는 각각의 세포수준에서의 변화를 알 수 없을 것이다. 그러나 배양된 세포를 이용한 실험의 경우에는 체내에서의 세포의 반응과는 다소 차이가 있을 수는 있으나 인접한 다른 세포나 조직으로부터의 영향을 배제할 수 있으므로 단일세포의 독립적인 반응을 확인할 수 있으리라 생각된다.

살아 있는 세포는 방사선 조사시 다양한 반응을 보인다. 포유동물에서 50 R 에서 나타나는 효과가 E. coli에서는 10,000 R, yeast에서는 30,000 R, Amoebae에서는 300,000 R에서 나타나며 같은 종인 경우에도 다양한 반응을 나타내는데 사람의 경우에도 세포의 종류와 상태에 따라 방사선에 대한 반응은 다르다<sup>17)</sup>. 김과 고<sup>18)</sup>는 MTT

\* 본 연구 논문은 1996년도 서울대학교 병원 지정진료 연구비 지원에 의한 것임.

(3-[4,5-Dimethylthiazol2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 이용하여 여러 암세포주의 방사선감수성을 연구하였고 고 등<sup>19)</sup>은 사람과 쥐에서 수종의 암세포주의 저선량 방사선감수성에 대해 연구하였다. Hall<sup>20)</sup>은 방사선감수성은 선량율에 크게 좌우된다고 발표하였고 Malaise 등<sup>21)</sup>은 여러 세포들의 감수성을 상,중,하로 분류하였으며 섬유아세포가 종양세포보다 방사선에 민감하다고 하였다. 고 등<sup>19)</sup>은 세포의 손상회복능과 방사선감수성의 상관관계를 사람의 세포를 이용하여 연구하였으며 김 등<sup>22)</sup>은 인체 구강내 섬유아세포의 방사선감수성을 연구하였다.

방사선감수성에 대한 평가방법으로 Carmichael 등<sup>23)</sup>은 MTT 분석과 집락형성능 평가를 이용하였으며 Elkind 등<sup>12)</sup>은 집락형성능평가를 이용하였다. 그러나 인체의 구강내 정상 세포와 암세포를 이용한 연구는 드물고 이들의 방사선감수성을 같은 실험 환경에서 연구한 것은 매우 드물다. 이에 본 연구는 방사선의 조사량증가와 조사방법에 따른 악구강영역에서 발생하는 편평상피암종세포와 구강내 치은섬유아세포의 생물학적 손상 정도를 정량적으로 분석하기 위해서 세포활성도변화와 독성변화를 세포수 검사, MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석<sup>24)</sup>, LDH(Lactate Dihydrogenase) 분석<sup>25)</sup>을 이용하여 비교해 보고자 하였다.

## II. 연구재료 및 연구방법

### 1. 세포주 및 세포배양

본 실험에서는 2종의 인체 암세포주와 1종의 정상 세포를 사용하였다. 인체 암세포주는 한국 세포주은행에서 분양받은 ATCC No. CCL17 (KB)인 인체의 구강내 유표피암종과 ATCC No. CCL30(RPMI 2650)인 인체의 비중격에서 발생한 분화도가 낮은 편평상피암으로부터 얻어진 세포주를 이용하였으며 정상세포로는 10대 여아의 건강한 치은에서 일차배양한 5내지 6계대(subculture)의 치은섬유아세포(GF)를 사용하였다. 이들 세포는 배양용기의 기저면에서 증식하

는 특성을 갖고 있다. 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Media(DMEM) (Gibco, USA)에 Fetal Bovine Serum(FBS) 10%와 Streptomycin-Gentamycin 1% 를 첨가하여 사용하였다. 배양용기로는 기저면의 면적이 25 cm<sup>2</sup>인 T-25 플라스크를 배양용기로 사용하였고 세포배양기에서 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C 조건으로 배양하였다.

### 2. 방사선조사

세포수 검사시에는 T-25 플라스크에 5×10<sup>5</sup> 개의 세포를 넣고 MTT와 LDH검사시에는 4-well dish에 well 당 5×10<sup>4</sup> 개의 KB 활성세포와 RPMI 2650, 치은섬유아세포를 각각 넣어 배양을 시작한 후 2일이 지나 각 well이 60%의 세포 밀도를 보이면 Cs-137 동물실험용 방사선 조사기(Mark type I, Shepherd, USA)를 사용하여 실온에서 선량을 241.5 cGy/min로 2, 4, 6, 10, 15, 20 Gy를 단일조사하고, 2 Gy와 5 Gy를 4 시간 간격으로 2회 분할 조사하여 총 조사량을 각각 4 Gy와 10 Gy 로 하였다.

### 3. 생존한 세포수 측정 및 세포의 형태 변화 관찰

배지 8 ml가 든 T-25 플라스크에 5×10<sup>5</sup> 개의 세포를 넣고 2 일간 배양 후 방사선을 조사하고 조사 후에 다시 4 일간 배양하여 Trypan blue로 사멸한 세포를 염색하고 혈구계를 이용하여 생존한 세포의 수를 측정하였다. 세포의 형태는 위상차현미경하에서 150배 확대하여 육안으로 관찰하였다.

### 4. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)분석

방사선조사 직후 배양액을 교환하고 3 일간 배양하고 MTT 분석을 위하여 4-well dish에서 96-well plate에 옮긴 후 1 일간 배양하고 MTT 용액(Sigma, U.S.A.) 50  $\mu$ l을 각 well에 넣고 4 시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 버리고

formazon 결정을 용해시키기 위하여 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 세포활성도를 ELISA reader (Bio-teck, Instruments Inc. Model EL 308, U.S.A.)로 550 nm에서 측정하였다. 세포활성도는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

### 5. LDH(Lactate Dihydrogenase) 분석

#### 1) 사멸한 세포의 LDH 분석

방사선조사 직후 배양액을 교환하고 4일간 배양한 후 괴사된 세포의 양을 알기 위하여 상층액을 50  $\mu$ l씩 96-well assay plate로 옮겼다. 이때 positive control을 위하여 20,000 : 1, 10,000 : 1, 5,000 : 1로 희석한 LDH control 용액도 같은

plate에 옮기고 배지도 옮겼다. LDH 분석 시약을 조제하여 분석하고자 하는 각 well에 50  $\mu$ l씩 옮기고 실온의 암실에서 30분간 유지한 후 반응정지액을 넣고 ELISA reader로 490 nm에서 측정하였다. 붉은색 결정이 나오므로 배지만의 값을 결과에서 제거하고 ELISA의 발색도의 값을 positive control로 얻은 그래프를 이용하여 Unit 단위로 바꾸었다. 단위인 unit는 L929세포  $1 \times 10^4$  개를 용해시켰을 때 나오는 효소와 같은 양이다.

#### 2) 생존한 세포와 사멸한 세포의 LDH 분석

4-well dish에  $5 \times 10^4$  개의 세포를 넣어 방사선을 조사하고 4일간 배양한 후 0.9% (v/v)

Table 1. Dose Response Chart of Living Cells Using Hemocytometer

	0	2	4	6	10	15	20(Gy)
RPMI	525	288	240	234	180	172	158
KB	418	286	169	105	67	52	38
GF	46	21	18	19	15	16	14

RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblasts

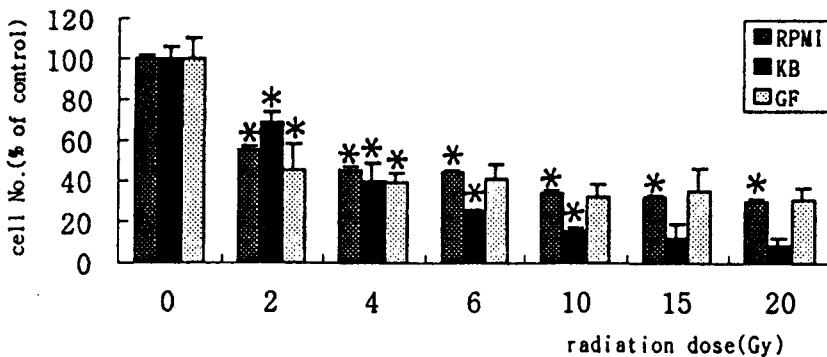


Figure 1. Dose Response Chart of Living Cells Using Hemocytometer.

RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblasts.

Range : standard deviation

\* : Statistically significant with adjacent groups (t-test value < 0.05 )

TritonX-100을 50  $\mu$ l씩 넣고 45 분간 배양하고 현미경으로 용해된 것을 확인한 후 250xg 에서 4 분간 원심분리하였다. 96-well plate에 well 당 상층액 50  $\mu$ l를 넣고 LDH 분석시약을 50  $\mu$ l 씩 넣은 후 30 분간 암실에서 유지하고 반응정지액을 넣은 후 즉시 측정하였다.

### III. 실험성적

#### 1. 생존한 세포수 측정 및 세포의 형태 변화 관찰

사용한 모든 세포에서 방사선조사 후에 생존한 세포수의 감소가 나타났으며 모든 세포가 2 Gy 이상의 조사량에서 대조군과 비교시 유의성

있는 차이를 보였다. 조사량에 따른 차이는 RPMI 2650은 2 Gy 부터 20 Gy까지 사용된 모든 조사량간에 유의성있는 차이를 보였으나 KB는 2, 4, 6, 10 Gy간에서만, GF는 2 Gy와 4 Gy 에서만 차이를 보였다(Table 1, Figure 1 참조). GF 는 2 Gy 에서 50%이상의 세포가 사멸되었으며 RPMI 2650과 KB는 4 Gy 에서 50% 이상의 세포가 사멸되었다.

분할조사한 경우에 생존한 세포수가 많았으며 4 Gy를 분할조사한 경우와 단일조사한 경우의 차이는 RPMI 2650은 2%, KB는 1%, GF는 13% 였고 10 Gy를 분할 조사한 경우와 단일 조사한 경우의 차이는 각각 2%, 3%, 2%였다 (Table 2, Figure 2 참조).

Table 2. Fractionation Response Chart of Living Cells Using Hemocytometer.

	unit: $\times 10^4$ cell/flask				
	0	4	10	2+2	5+5(Gy)
RPMI 2650	525	240	180	248	192
KB	418	169	67	173	83
GF	46	18	15	24	16

RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblasts

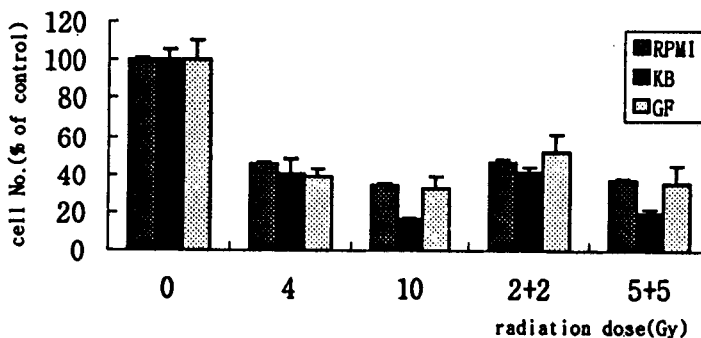


Figure 2. Fractionation Response Chart of Living Cells Using Hemocytometer

RPMI 2650 : CCL30, KB: CCL17, GF : primary gingival fibroblasts

Range : standard deviation

\* : Statistically significant with single exposure group (t-test value < 0.05 )

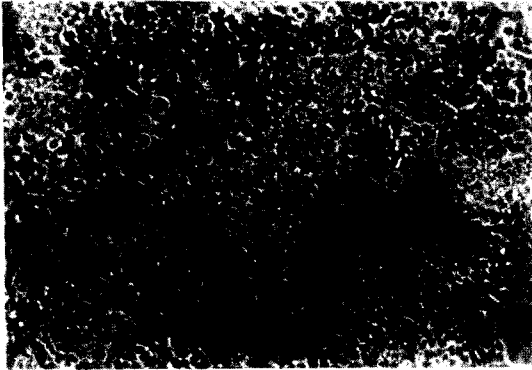


Figure 3 a. Control of KB



Figure 3 b. Surviving KB cells. 4 Days Later with 20Gy

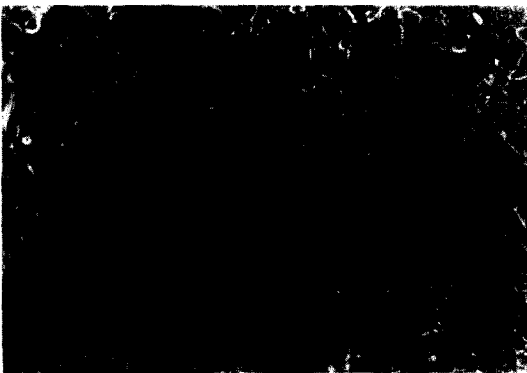


Figure 3 c. Control of RPMI 2650

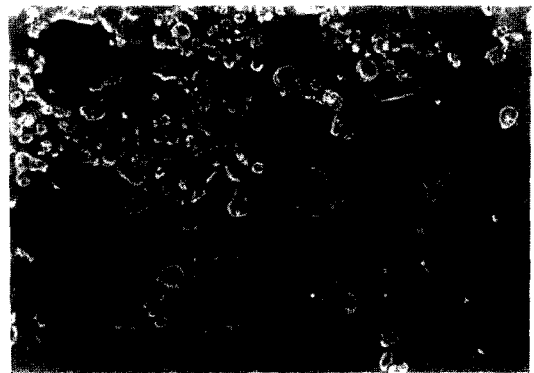


Figure 3 d. Surviving RPMI 2650, 4 Days Later with 20 Gy

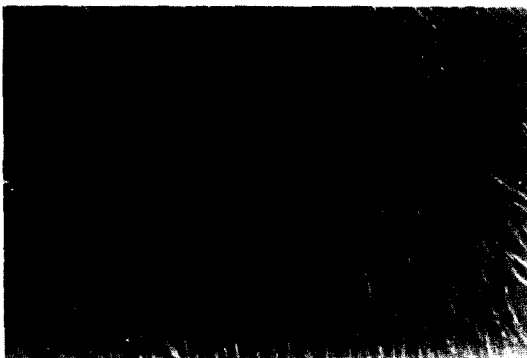


Figure 3 e. Control of the Primary Gingival Fibroblasts.

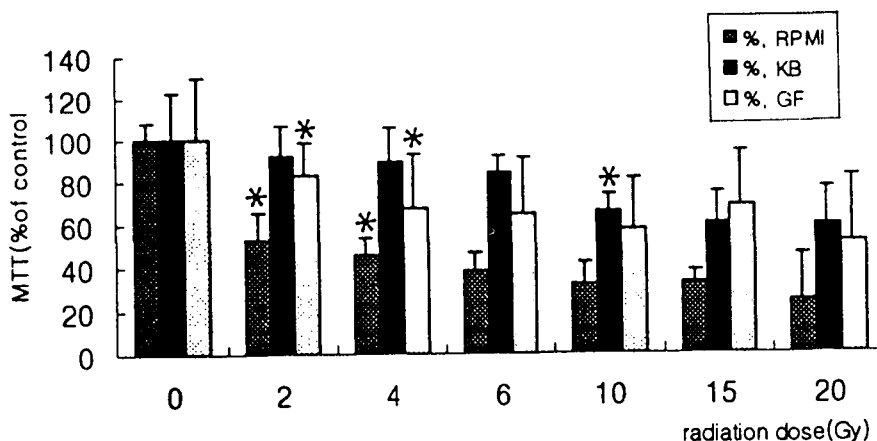


Figure 3 f. Surviving Gingival Fibroblasts, 4 Days Later with 20 Gy.

**Table 3.** Optical Density Signal as the Dose of the Radiation on Cells by the MTT Assay.

	0	2	4	6	10	15	20(Gy)
RPMI 2650	1.82	0.95	0.83	0.69	0.57	0.59	0.44
KB	1.59	1.46	1.42	1.32	1.04	0.96	0.94
GF	1.31	1.07	0.88	0.84	0.74	0.89	0.68

RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblasts



**Figure 4.** Optical Density Signal as the Dose of the Radiation on Cells by the MTT Assay.

RPMI 2650 : CCL30, KB: CCL17, GF : primary gingival fibroblasts

Range : standard deviation

\* : Statistically significant with adjacent groups (t-test value < 0.05 )

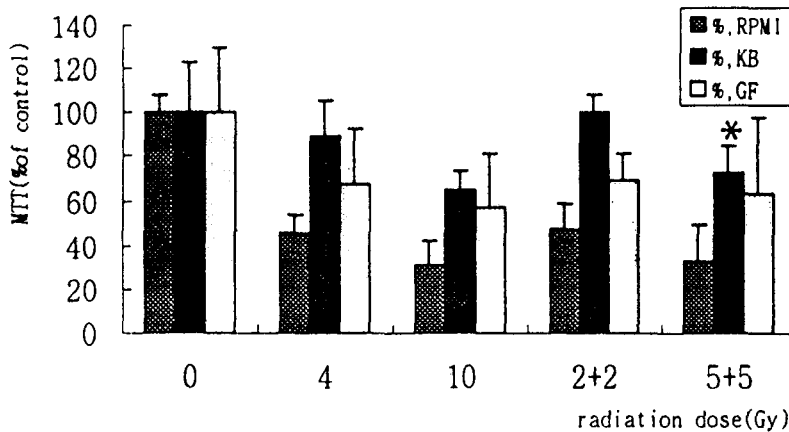
**Table 4.** Optical Density Signal as Fractionation of the Radiation on Cells by the MTT Assay.

	0	4	10	2+2	5+5(Gy)
RPMI 2650	1.82	0.83	0.57	0.86	0.60
KB	1.59	1.42	1.04	1.60	1.16
GF	1.31	0.88	0.74	0.90	0.82

RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblast

방사선조사 후에 중앙 세포들은 넓게 퍼져서 바닥에 붙어 있었으며 여러 개의 분열된 핵들이 관찰되었고 사멸하여 기저면에서 떨어져 나와

부유하고 있는 세포들이 많았다. 치은섬유아세포는 형태의 변화가 거의 없었으나 세포수가 다소 감소하였으며 세포간 경계가 불분명하였다



**Figure 5.** Optical Density Signal as Fractionation of the Radiation on Cells by the MTT Assay.  
 RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblast  
 Range : standard deviation  
 \* : Statistically significant with single exposure group (t-test value( 0.05 )

**Table 5.** LDH Concentration(U/ml) in Supernatant as the Dose of the Radiation.

	0	2	4	6	10	20(Gy)
RPMI 2650	0.40	0.77	0.93	0.99	0.97	0.91
KB	2.67	2.90	3.05	2.91	3.09	3.40
GF	0.59	0.66	0.60	0.65	0.65	0.74

RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblast

(Figure 3 a - f 참조).

## 2. MTT 분석

MTT 분석 결과 세포활성도는 방사선조사량이 증가함에 따라 감소하였으며 RPMI 2650과 GF는 2 Gy 이상에서, KB는 4 Gy 이상에서 대조군과 유의성 있는 차이를 보였다. 조사량에 따른 차이는 RPMI 2650 과 GF는 2 Gy와 4 Gy 간에 서만, KB는 6 Gy와 10 Gy 간에서만 유의성 있는 차이를 보였다(Table 3, Figure 4 참조).

분할 조사한 경우에는 단일 조사한 경우에 비

해 세포활성도의 감소율이 적었으며 그 차이는 4 Gy의 경우는 RPMI 2650은 2%, KB는 11%, GF는 1%였으며 10 Gy의 경우는 각각 1%, 7%, 6% 였다 (Table 4, Figure 5 참조).

## 3. LDH 분석

### (1) 사멸한 세포의 LDH 분석

사멸한 세포의 LDH 분석 결과 방사선조사량의 증가에 따라 LDH 양이 증가되었으며 RPMI 2650과 GF는 2 Gy 이상에서, KB는 4 Gy 이상에서 대조군과 유의성있는 차이를 보였고 이는

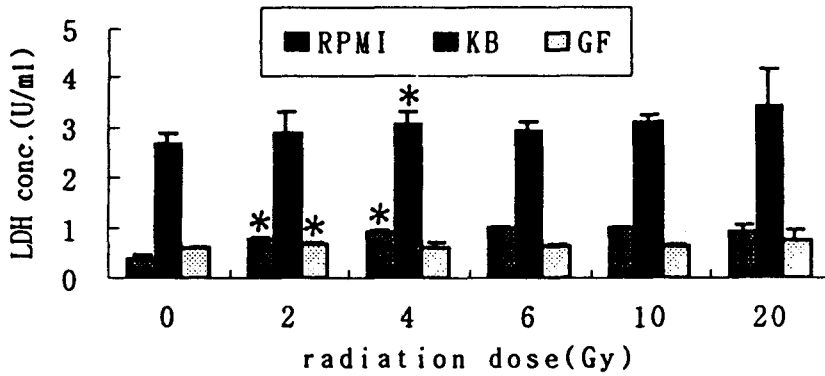


Figure 6. LDH Concentration(U/ml) in Supernatant as the Dose of the Radiation  
 RPMI 2650: CCL30, KB: CCL17, GF: primary gingival fibroblasts  
 Range: standard deviation  
 \*: Statistically significant with adjacent groups (t-test value< 0.05)

Table 6. LDH Concentration(U/ml) in Supernatant as Fractionation of the Radiation

	0	4	10	2+2	5+5(Gy)
RPMI 2650	0.40	0.93	0.97	0.90	0.96
KB	2.67	3.05	3.09	3.20	3.67
GF	0.59	0.60	0.65	0.59	0.56

RPMI 2650 : CCL30, KB : CCL17, GF : primary gingival fibroblast

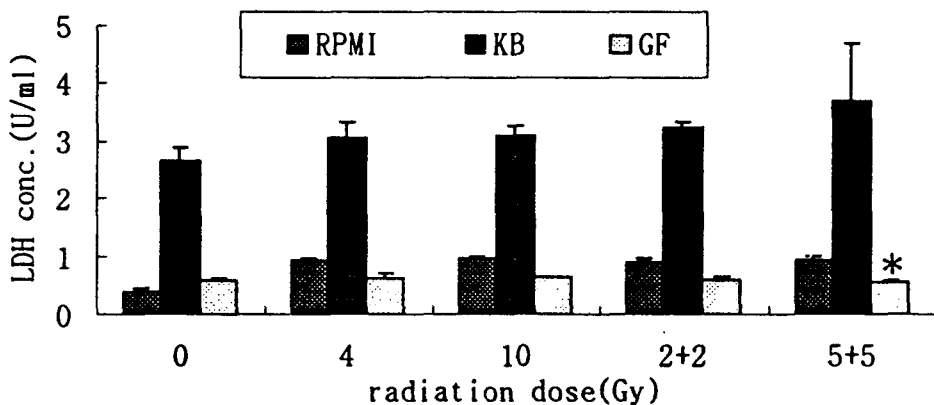


Figure 7. LDH Concentration(U/ml) in Supernatant as Fractionation of the Radiation  
 RPMI 2650 : CCL30, KB: CCL17, GF : primary gingival fibroblasts  
 Range : standard deviation  
 \*: Statistically significant with single exposure group (t-test value< 0.05 )



Table 7. LDH Concentration(U/ml) in the Wells as the Dose of the Radiation

	0	2	4	6	10	15	20(Gy)
RPMI 2650	1.00	1.29	1.24	1.25	1.16	1.17	1.16
KB	3.95	3.92	3.83	3.46	3.41	3.00	3.29
GF	1.54	1.16	0.86	1.15	1.09	1.06	0.91

RPMI 2650 : CCL30, KB: CCL17, GF : primary gingival fibroblasts

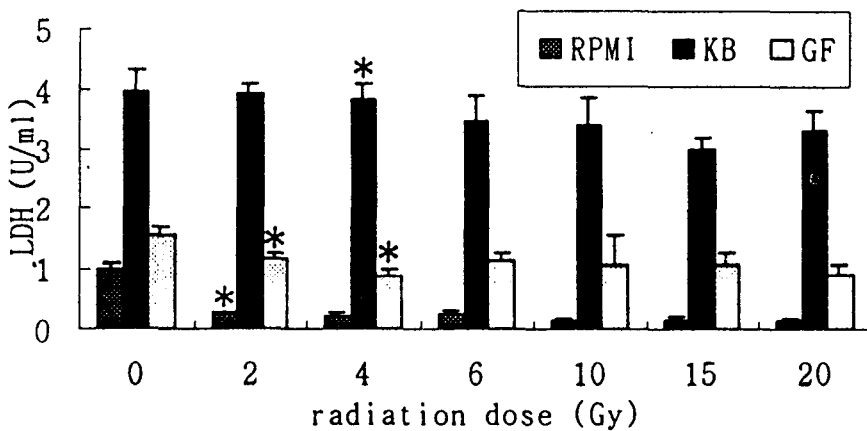


Figure 8. LDH Concentration(U/ml) in the Wells as the Dose of the Radiation

RPMI 2650: CCL30, KB: CCL17, GF: primary gingival fibroblasts

Range: standard deviation

\*: Statistically significant with adjacent groups (t-test value < 0.05 )

MTT 분석 결과와 유사했다. 조사량에 따른 차이는 RPMI 2650의 경우에 2 Gy와 4 Gy간에서 유의성있는 차이를 보였다(Table 5, Figure 6 참조).

분할조사한 경우에는 단일 조사한 경우에 비해 RPMI 2650과 GF에서는 LDH 양이 감소하였고 KB에서는 증가하였으나 유의성있는 차이를 보인 경우는 10 Gy를 5 Gy씩 GF에 분할 조사한 경우뿐이었다(Table 6, Figure 7 참조).

(2) 생존한 세포와 사멸한 세포의 LDH 분석  
생존한 세포와 사멸한 세포의 LDH 분석 결과

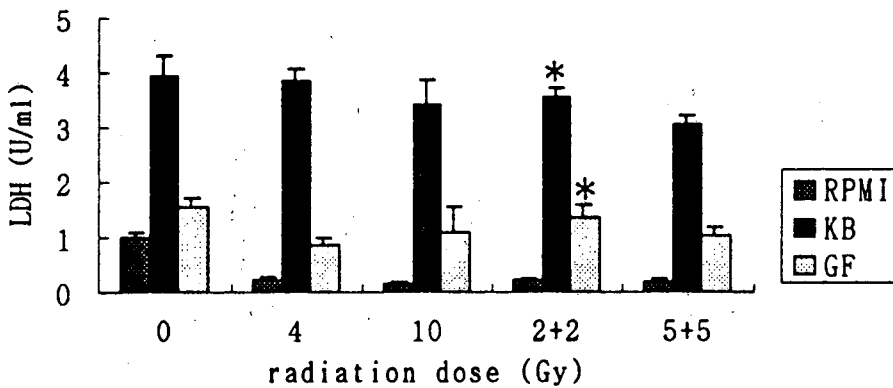
방사선조사량의 증가에 따라 LDH 양이 감소되었으며 RPMI 2650과 GF는 2 Gy 이상에서, KB는 4 Gy 이상에서 대조군과 유의성있는 차이를 보였으며 변화폭과 양상은 MTT 분석결과와 유사하였다. 조사량에 따른 차이는 GF의 경우에만 2 Gy와 4 Gy간에서 유의성있는 차이를 보였다(Table 7, Figure 8 참조).

분할 조사한 경우에는 단일 조사한 경우에 비해 RPMI 2650과 KB에서는 LDH 양이 감소하였고 GF에서는 증가하였다. 유의성있는 차이를 보인 경우는 4 Gy를 2 Gy씩 KB와 GF에 분할 조사한 경우였다(Table 8, Figure 9 참조).

**Table 8.** LDH Concentration(U/ml) in the Wells as Fractionation of the Radiation

	0	4	10	2+2	5+5(Gy)
RPMI 2650	1.00	1.24	1.16	0.21	0.20
KB	3.95	3.83	3.41	3.55	3.05
GF	1.54	0.86	1.09	1.37	1.02

RPMI 2650 : CCL30, KB: CCL17, GF : primary gingival fibroblasts



**Figure 9.** LDH Concentration(U/ml) in the Wells as Fractionation of the Radiation

RPMI 2650 : CCL30, KB: CCL17, GF : primary gingival fibroblasts

Range : standard deviation

\* : Statistically significant with single exposure group(t-test value< 0.05)

## V. 총괄 및 고안

방사선에 의한 세포의 손상에는 세포의 사멸과 분열지연이 있으며<sup>26)</sup> 이러한 세포의 손상 정도를 분석하기 위한 방법으로는 생존한 세포수 측정, MTT 분석, LDH 분석 등이 있다. 이중 세포수 측정과 MTT 분석은 세포활성도를 분석하기 위해 사용되며 LDH 분석은 사멸한 세포수를 분석하기 위해 사용되는데 본 연구에서도 생존한 세포수를 분석하기 위해 세포수 검사법과 MTT 분석을 이용하였다. Mossman<sup>24)</sup>에 의해 처음 개발되어 사용되고 있는 MTT 분석은 사립체의 호박산탈수효소에 의해 용해성 MTT tet-

razolium 염이 청색의 불용성 MTT formazan으로 환원되는 기전에 기초하고 있다. 이 방법은 간단하고 방사성동위원소를 사용하지 않아서 많이 이용되고 있으나<sup>23,27-33)</sup> 여러 요인들이 MTT 값을 변화시킨다고 알려져 있다<sup>34)</sup>. 따라서 본 실험에서는 MTT 값에 변화를 줄 수 있는 여러 요인을 제거시키기 위해 배양시간을 같게 하고 pH는 5 이상으로 하였으며 그 결과 serum은 25% 이하였고 배양중 용해물질은 없었으며 감염도 없었다.

두 가지 방법에 의한 연구 결과를 비교해 보면 전반적인 결과사이에는 통계학적으로 중등도의 상관관계를 보였으나(Correl value 0.46) 방사선

조사량에 따라 차이가 있었다. 조사량이 10 Gy 이상인 경우에는 두 방법이 거의 같은 결과를 보였으나 2 Gy 조사량에서는 두 방법으로 얻어진 생존율에 많은 차이가 있었다. 즉 생존한 세포수 측정 분석으로는 섬유아세포의 생존율이 50%가 되지 않았으나 MTT 분석으로는 80% 이상의 생존율을 보여 임상에서 간단하고 빠른 방법으로 널리 사용되고 있는 MTT 분석의 사용시 방사선조사량이 고려되어야 한다고 생각한다. 왜냐하면 실제적으로 방사선치료시 사용되고 있는 1 일 방사선조사량이 2 Gy 내외이므로 이 범위에서의 변화가 중요하기 때문이다.

방사선조사량이 작은 경우에 나타나는 두 방법간의 결과 차이는 생존한 세포의 효소능 때문으로 생각한다. 왜냐하면 위상차현미경으로 세포를 관찰하였을 때 세포들이 다소 커져 있고 여러 개의 핵을 가지고 있었는데 이들을 혈구계를 이용하여 세었을 때는 하나의 세포로 취급되긴 하였으나 세포내 효소의 양은 다소 많았으리라 생각되기 때문이다. 그러나 조사량이 증가됨에 따라 생존한 세포의 활성도가 현저히 저하되어 세포내 효소의 양이 정상 세포보다 많지 않게 되면서 세포수 측정에 의한 결과와 MTT 분석의 결과는 일치하게 된다고 생각된다.

세포의 손상 정도를 분석할 수 있는 또 다른 방법인 LDH 분석은 세포가 괴사되어 파괴될 때 세포밖으로 나오는 LDH의 양을 측정하는 방법이다. 세포 내용물 중의 하나인 LDH는 중요한 호흡효소로서 상당히 안정적이며<sup>13,25)</sup> 세포가 파괴되면 세포밖으로 나오게 되는데<sup>35,36)</sup> 이것의 양을 발색반응으로 측정하여 정량적으로 분석할 수 있다.<sup>25,32,37-41)</sup> 방사선조사후 4 일째에 배지에 존재하는 LDH 양을 분석한 결과 방사선조사량이 증가함에 따라 암세포의 경우는 사멸한 세포의 수가 다소 증가하는 경향이 있었으나 그 증가량은 작았으며 GF의 경우는 방사선조사량에 대한 변화가 거의 없었다. 또한 생존한 세포와 사멸한 세포를 함께 분석하였을 때 방사선조사량이 증가함에 따라 총 세포량은 감소함을 알 수 있었는데 이 결과는 생존한 세포수의 차이가 사멸한 세포수의 차이로 인한 결과만은 아니라는

것을 나타내 준다. 이 경우 생각해 볼 수 있는 다른 요인으로는 생존한 세포의 분열능의 저하를 들 수 있다. 따라서 2 Gy에서 20 Gy 범위의 방사선조사량에서는 분열 지연에 의한 세포수 감소가 세포사로 인한 세포수 감소와 같이 중요한 요인이 될 수 있다는 것을 알 수 있으며 이러한 분열 지연은 방사선조사 후에 위상차현미경에서 관찰되었던 불분명한 핵막과 여러 개의 핵을 가진 크고 퍼져 있었던 암세포들에서 일어나는 것으로 생각된다.

방사선조사 후에 나타나는 세포의 형태학적 변화는 세포의 종류에 따라 다르다<sup>42)</sup>. 본 실험에서 사용한 세포중 2 개의 암세포주에서는 방사선조사 후 세포의 형태 변화가 심하였으나 섬유아세포는 형태학적 변화가 거의 없었다. 따라서 세포의 방사선 감수성에 대해 알고자 할 때에는 생존한 세포수나 양에 대한 정량적인 분석 외에 생존한 세포의 손상 정도에 대한 것도 함께 고려해야 할 것이다. 본 실험에서 생존한 세포가 넓고 울퉁불퉁하게 늘어져 있었고 진한 핵이 여러 개로 관찰되었는데 이러한 세포 형태는 apoptosis된 세포의 형태와 유사하였다.<sup>43-45)</sup> 따라서 생존한 세포중에 apoptosis가 존재하는지의 여부와 그 양에 관한 연구가 계속되어야 한다고 생각된다.

방사선조사량에 따른 방사선감수성은 2 Gy에서 20 Gy까지의 모든 조사량에서 정상 세포에 비하여 암세포에서 더욱 민감하였는데 모든 조사량에서 정상 세포와 비교시 유의성있는 차이를 보였으며 인접 조사량간의 차이도 대부분에서 관찰되었다. 그러나 정상 세포인 섬유아세포는 2 Gy와 4 Gy에서 생존율이 급격히 저하된 후 그 이상의 조사량에서는 별 차이를 보이지 않았으며 20 Gy 조사량의 경우도 위상차현미경상에서 형태 변화가 거의 없었다. 따라서 정상 섬유아세포는 2 Gy 내외의 조사량에서는 방사선에 매우 민감하다고 할 수 있겠으나 고선량에서는 비교적 방사선저항성(radioresistance)이 크다고 할 수 있겠다. Malaise<sup>21)</sup>는 정상 섬유아세포가 암세포보다 방사선에 민감하다고 발표하였는데 본 연구의 결과로 미루어 이것이 모든 조사량에

해당된다고 할 수는 없다. 그러나 앞에서도 언급한 바와 같이 실제 임상에서 방사선치료에 사용되는 조사량이 2 Gy 내외이므로 저선량의 방사선에 대한 민감도가 많은 고려 대상이 된다.

분할조사는 정상세포와 암세포의 회복율의 차이를 이용하여 정상세포의 재활에 기여하고 산소압의 증가로 인한 암세포의 방사선감수성을 높이는 효과를 주므로 방사선치료에 널리 이용되고 있다<sup>46)</sup>. 방사선감수성은 세포의 내재적감수성의 차이 외에 환경에도 좌우된다. 예를 들면 국소적인 산소분압에 영향을 받을 수 있는데 포유동물에서 방사선조사시 온도가 저하되어 방사선에 대한 손상이 감소되는 것은 온도에 의한 효과가 아니라 조직의 부분적 산소압의 감소로 나타나는 효과 때문이라고 알려져 있다<sup>46)</sup>. 또한 방사선조사시 고온을 가하면 방사선 위해작용은 서로 상승작용을 하게 되는데 이것은 방사선조사에 의해 생성된 과산화물, 과산화수소 등이 고온에서는 대사작용이 증가되므로 발생하는 것이라는 보고가 있다<sup>47)</sup>. 따라서 내재적 방사선감수성을 조사할 때는 온도를 일정하게 하여야 한다. 중등도의 방사선감수성을 보이는 세포들이 방사선조사 후 1.5-2.5 시간 배양하면 방사선에 대한 잠재적치사손상(latent lethal damage)의 50%를 회복하며 4 시간 배양하면 대부분이 회복되는 것으로 알려져 있다<sup>48)</sup>. 고 등<sup>19)</sup>은 사람의 표피 암세포를 0.5 시간에서 6 시간 간격으로 분할 조사하였을 때 2 시간 내외에서 포화상태에 도달한다고 보고하였고 Suit<sup>49)</sup>는 4 시간의 분할간격을 두어 실험하였다. 본 실험에서는 4 시간 간격으로 분할 조사하여 암세포와 정상세포의 반응을 알아보았는데 모든 경우 생존한 세포수는 증가되었고 사멸한 세포수는 KB에서는 증가하였으나 RPMI 2650과 섬유아세포에서는 감소하였다. 분할 조사시는 손상의 회복으로 인해 방사선감수성이 낮아진다고 생각되었지만 방사선에 의한 손상의 회복 정도는 분할 조사간의 간격, 선량을, 횟수에 따라 다양하다고 하였다<sup>49)</sup>.

본 실험에서도 조사 조건을 같이 하여 분할 조사를 시행하였으며 단일 조사와 비교시 세포 종류에 따라 다양한 차이를 보였다. 섬유아세포는

2 Gy씩 2 회 조사하였을 때 4 Gy를 단일 조사한 경우에 비해 생존한 세포수가 13% 증가한 반면 사멸된 세포수는 감소하였으나 KB는 생존한 세포수가 1% 증가하고 사멸한 세포수도 증가하여 두 세포는 강한 대조를 보였다. 그러나 RPMI 2650은 같은 조건에서 생존한 세포수는 2% 증가하고 사멸한 세포수는 감소하였다. 따라서 암세포와 암세포 주위의 정상세포간에 분할 조사에 대한 반응을 나타내는 상대적인 방사선감수성을 구하여 기존에 이용되고 있는 각 세포들의 절대적인 방사선감수성에 더하여 임상에 응용한다면 최소한의 정상세포의 희생과 최대한의 암세포의 손상이 있어야 하는 분할 조사 계획에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

#### IV. 결 론

한국세포주은행에서 분양받은 사람의 암세포 주 2종(KB, RPMI 2650)과 10대 여아의 건강한 치은으로 일차배양한 섬유아세포를 이용하여 2, 4, 6, 10, 15, 20 Gy를 단일 조사하고 4, 10 Gy를 2회로 분할조사하여 각각의 감수성을 조사하였다. <sup>137</sup>Cs의 동물실험용 방사선조사기를 이용하여 241.5 cGy/min의 선량율로 실온에서 조사하였다. Trypan blue로 염색후 사멸세포를 배제하고 혈구계를 이용하여 생세포수를 검사하는 방법과 MTT 분석, LDH 분석을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 방사선조사 후에 모든 세포에서 생존한 세포수가 감소하였으며 분할 조사한 경우에 단일 조사한 경우보다 생존한 세포수가 많았다.
2. 방사선조사 후에 중앙 세포의 형태 변화는 뚜렷하였으나 치은섬유아세포의 형태 변화는 거의 없었다.
3. MTT 분석결과 RPMI 2650과 섬유아세포는 2 Gy 이상에서, KB는 4 Gy 이상에서 방사선조사량의 증가에 따라 세포활성도가 감소하였으며 분할 조사한 경우에 KB에서 세포활성도의 감소율이 유의성있게 적었다.
4. 사멸한 세포의 LDH 분석결과 RPMI 2650과

섬유아세포는 2 Gy 이상에서, KB는 4 Gy 이상에서 LDH 양이 증가되었으며 10 Gy를 분할 조사한 경우에 섬유아세포에서 단일 조사한 경우에 비해 LDH 양이 유의성있게 감소하였다.

5. 생존한 세포와 사멸한 세포의 LDH 분석 결과 방사선조사량의 증가에 따라 LDH 양이 감소되었으며 4 Gy를 분할 조사한 경우에 LDH 양이 KB에서는 감소하였고 섬유아세포에서는 증가하였다.

### 참고문헌

1. 조효석, 유동수 : 방사선조사가 백서구치법랑질발육에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구. 치과방사선 25 : 483-500, 1995.
2. 나춘화, 유동수 : 방사선 조사시기에 따른 백서 설상피의 기저세포에 미치는 영향에 관한 연구. 치과방사선 25 : 343-362, 1995.
3. 이경호, 박태원 : 방사선조사가 백서 구치 법랑질형성에 미치는 영향에 관한 주사전자현미경적 연구. 치과방사선 25 : 409-422, 1995.
4. 박명선, 박태원 : 방사선조사가 하악과두에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구. 치과방사선 26 : 45-55, 1996.
5. 고병희, 함창곡, 김정진 : 단일조사와 분할조사시 마우스 공장 소낭선세포의 방사선효과에 관한 실험적 연구. 대한치료방사선과학회지 3(1) : 1-8, 1985.
6. 최영희, 박찬일, 한만청 : 반복온열요법이 방사선조사효과에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한치료방사선과학회지 2(1) : 1-9, 1984.
7. 허승재, 박찬일 : 마우스공장 소낭선세포의 방사선 감수성에 관한 실험적 연구. 대한치료방사선과학회지 3(1) : 9-12, 1985.
8. 강운선, 고재승, 황성명 : 순차 효소 소화기법에 의하여 분리한 골조조직세포의 형태학적 및 세포화학적 특성에 관한 연구. 대한구강해부학회지 12 : 17-30, 1988.
9. Baker FL, Spitzer G, Ajani JA, Brock WA, Luke-man J, Pathak S, Tomasoni B, Thielvoldt D, Wil-lians M, Vines C, Tofilon P : Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor cells using cell-adhesive matrix and supplemented medium. Cancer Res 46 : 1263-1274, 1986.
10. Puck TT, Marcus PI : Action of X-rays on mam-malian cells. J Exp Med 103 : 653-666, 1956.
11. Marin G, Bender MA : Radiation induced mamma-lian cell death, Lapsttime cinemicrographic obser-vations. Exp Cell Res 43 : 413-423, 1966.
12. Elkind MM, Han A, Volz KW : Radiatioin response of mammalian cells grown in culture. IV. Dose dependence of divition delay and postirradiation growth of surviving delay and postirradiation growth of surviving and nonsurviving Chinese hamster cells. J Nat Cancer Inst 30 : 705-721, 1963.
13. Arlett CF, Harcourt SA : Survey of radiosensitivity in a variety of human call strains. Cancer Res 40 : 926-932, 1980.
14. Choi EK, Yang KM, Yi BY, Chang HS, Kim SY, Nam JH, Yu ES, Lee IC : In Vitro intrinsic radio-sensitivity of human squamous cell carcinoma in promary culture. J Korean Soc Ther Radiol 12(1) : 27-31, 1994.
15. 이경영, 박재갑, 아디 가즈다, 로리 골드스타인, 황이숙, 김진복 : 인체 암세포주의 MDR1 유전자 발현도와 항암제 감수성에 관한 연구. 대한암학회지 22(1) : 37-47, 1990.
16. Hayashi ABS, Yoshida Y, Tanaka H, Arima M : Variable radiosensitivity in fibroblasts from pat-ients with tuberous sclerosis. J Investigated Der-mat 84 : 79, 1985.
17. Park JK, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM : Chemosensitivity testing of haman colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. Cancer Res 47 : 5875-5879, 1987.
18. 김민숙, 고광준 : 수종의 암세포주의 저선량방사선감수성에 관한 연구. 치과방사선 24 : 249-260, 1994.
19. 고경환, 하성관, 박찬일 : 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구. 대한치료방사선학회지 11 : 17-27, 1993.
20. Hall EJ, Marchese M, Hei TK, Zauder M : Radia-tion response characteristics of human cells in vitro. Radiat Res 114 : 415-424, 1988.
21. Malaise EP, Deschavanne PJ, Fertil B : The rela-tionship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells. Int J Radiat Bio 56 : 597-604, 1989.

22. 김일호, 김수남, 이동근, 엄인용 : 인체구강내 섬유아 세포의 방사선 감수성에 관한 연구. 대한구강악안면 외과학회지 20 : 570-582, 1994.
23. Carmichael J, DeGraff WG, Gazda AF, Minna JD, Mitchell JB : Evaluation of a Tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 47 : 943-946, 1987.
24. Mossmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65 : 55-62, 1983.
25. Wroblewski F, LaDue JS : Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 90 : 2100-213, 1955.
26. 유동수, 박태원, 이상래, 김재덕 등 : 구강악안면방사선학 2판, 이우출판사, 서울, 1996.
27. Yufang S, Barbara SK, Rashmin S, Eva AT : A rapid, multiple colorimetric assay for chemotaxis. *J Immunol Meth* 164 : 149-154, 1993.
28. Stuart ML, Richard DD : A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Inf Dis* 152 : 938-945, 1985.
29. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D : Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Cell* 77 : 817-827, 1994.
30. Mark G, Steven CO : Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *J Immunol Meth* 157 : 225-231, 1993.
31. Carmichael J, DeGraff WG, Gazda AF, Minna JD, Mitchell JB : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47 : 936-942, 1987.
32. Jover R, Ponsoda X, Castell V, Gomez-Lechon MJ : Acute cytotoxicity of ten chemicals in human and rat cultured hepatocytes and in cell lines : Correlation between in vitro data and human lethal concentrations. *Toxic Vitro* 8 : 47-54, 1994.
33. Campling BG, Pym J, Galbraith PR, Cole SPC : Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leukemia Res* 12(10) : 823-831, 1988.
34. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K : Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Meth* 119 : 203-210, 1989.
35. Gulliksson H : Adenylate kinase as a marker for platelet lysis. *Transfusion* 30 : 536-540, 1990.
36. Kitamura C, Terashita M, Toyoshima K, Noguchi T : The presence of vesicles containing lactate dehydrogenase on the ameloblast layer of bovine enamel organ. *Jap Oral Biol* 38 : 37-41, 1993.
37. Yu DS, Chang SY, Chen A, Ma CP, Su CJ, Chu TM : Effects of high-energy shock waves on murine renal cell carcinoma. *Urology* 34 : 571-576, 1991.
38. Niks M, Otto M, Busova B, Stefanovic J : Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *J Immunol Meth* 126 : 263-271, 1990.
39. Jayne AB, Steven NE : Rat mesangial cell lysis in vitro is induced by cationic polypeptides. *Am J Pathol* 142 : 529-539, 1993.
40. Tinton SA, Lefebre VH, Cousin OC, Buc-Calderon PM : Cytolytic effects and biochemical changes induced by extracellular ATP to isolated hepatocytes. *Biochimica Biophysica Acta* 1176 : 1-6, 1993.
41. Mbugua PM, Welder AA, Acosta D : Cardiotoxicity of kenyan green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) venom and its fractionated components in primary cultures of rat myocardial cells. *Toxicology* 52 : 187-207, 1988.
42. Kim JH, Kim OB, Choi TJ : Ultrastructural effects of irradiation on squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Korean Soc Ther Radiol* 9 : 303, 1993.
43. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV : Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73 : 2013 - 2026, 1994.
44. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR : Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251 - 306, 1980.
45. Potten CS, Merritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A : Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int J Radiat Biol* 65 : 71-78, 1994.
46. Dalrymple GV, Gauden ME, Kollmorgen GM, Vogel HH : Medical radiation biology. W B Saunders Philadelphia, 1973.

47. Konings AWT : Effects of heat and radiation on mammalian cells. *Radiat Phys Chem* 30 : 339-349, 1987.
48. Hahn GM, Stewart JR, Yang SJ, et al : Chinese hamster cell monolayer culture I. changes in cell dynamics and modifications of the cell cycle with the period for growth. *Exp Cell Res* 49 : 285,1968.
49. Suit HD : Consideration of fractionation schedules for radiation dose. *Radiol* 105 : 151-156, 1972.

-ABSTRACT-

## AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE CHANGE OF THE RADIOSENSITIVITY OF SEVERAL TUMOR CELL LINES AND PRIMARY CULTURED GINGIVAL FIBROBLAST

Sam-Sun Lee, D.D.S. M.S.D., Dong-Soo You, D.D.S., Ph.D.

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University*

Radiation sensitivity data was generated for two human cancer cell lines(KB, RPMI 2650) and human primary gingival fibroblast was tested three times using a viable cell number counting with a hemocytometer, MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, and LDH(Lactate dehydrogenase) assay. Single irradiation of 2, 4, 6, 10, 15, 20 Gy were applied to the tumor cell lines and the primary cultured gingival fibroblast. The two fractions of 4 Gy and 10 Gy were seperated with a 4 hour time interval. The irradiation was done with 241.5 cGy/min dose rate using <sup>137</sup>Cs MK cell irradiator at room temperature.

The obtained results were as followed :

1. There was significantly different viable cell numbers as the amount of radiation dose on the tested cells were cell number counted with a hemocytometer. In fractions, there were more viable cells remaining.
2. Phase-contrast microscopically, radiation-induced morphologic changes were pronounced on the tumor cells, however, almost no differences on the gingival fibroblast.
3. There was significantly different absorbance at 2 Gy on RPMI 2650, 4 Gy on KB and GF in MTT assay. In fractions, the absorbance was significantly higher on KB.
4. The level of extracellular LDH activity in the experimental group was significantly higher in the 2-4 Gy than the control group.
5. The total level of extracellular and intracellular LDH activity was decreased as increased amounts of radiation dose was applied.

---

\* Key words : Irradiation, Radiation Sensitivity, MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol2-y]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), LDH, Fractionation