

# 방사선의 선량변화가 수종의 정상세포와 종양세포주의 세포활성도와 apoptosis 유발에 미치는 영향

박인우, 이삼선\*, 허민석\*, 최순철\*

강릉대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실,

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 치학연구소\*

## Effect of Radiation Dosage Changes on the Cell Viability and the Apoptosis Induction on Normal and Tumorigenic Cells

In-Woo Park, Sam-Sun Lee\*, Min-Suk Heo\*, Soon-Chul Choi\*

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry,*

*Kangnung National University*

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute,*

*College of Dentistry, Seoul National University\**

**Purpose :** The study was aimed to detect the differences in the cell viability and the apoptosis induction after irradiation on normal and tumorigenic cells.

**Materials and Methods :** The study, that was generated for two human normal cells(RHEK, HGF-1) and two human tumor cells(KB, HT-1080), was tested using MTT assay at 1 day and 3 day after irradiation and TUNEL assay under confocal laser scanning microscope at 1 day after irradiation. Single irradiation of 0.5, 1, 2, 4, and 8 Gy were applied to the cells. The two fractions of 1, 2, 4, and 8 Gy were separated with a 4-hour time interval. The irradiation was done with 5.38 Gy/min dose rate using Cs-137 irradiator at room temperature.

**Results and Conclusions :**

1. In 3-day group, the cell viability of HGF-1 cell was significantly decreased at 2, 4 and 8 Gy irradiation, the cell viability of KB cell was significantly decreased at 8 Gy irradiation and the cell viability of HT-1080 cell was significantly decreased at 4 and 8 Gy irradiation.
2. There was significant difference between RHEK and KB cell line in the cell viability of 3-day group at 8 Gy irradiation. There was significant difference between RHEK and HGF-1 cell line in the cell viability of 3-day group at 4 and 8 Gy irradiation.
3. There was a significantly decreased cell viability in 3-day group than those in 1-day group at 2, 4 and 8 Gy on HGF-1 cell, at 4 and 8 Gy on HT-1080 cell, at 8 Gy on KB cell.
4. We could detect DNA fragmented cells only on KB cell. Number of apoptotic cells of KB cell was significantly increased at 4 and 8 Gy irradiation. However, there was no correlation between cell viability and apoptosis.
5. On all 4 cell lines, there were no differences between single and split irradiation method in cell viability and apoptosis. (*J Korean Oral Maxillofac Radiol 1999;29:435-450*)

**Key words :** irradiation, cell viability, apoptosis, MTT assay, TUNEL assay

## I. 서 론

전리방사선에 의한 세포손상의 주된 기전은 방사선 노출 후 인체 내에 생성된 이온들에 의한 DNA 이중나선형 구조의 파괴와 연이어 발생하는 염색체 이상 및 세포분열 이상 등으로 알려져 있다.<sup>1,2</sup> 방사선치료의 효과에는 종양의 크기, 종양의 조직학적 종류 및 분화정도, 종양의 증식속도, 총 방사선량 및 방사선조사 방법 등 많은 인자가 관여한다.<sup>3</sup> 종양세포는 다양한 고유의 방사선감수성을 가지고 있으며 그것이 유래되는 정상조직의 방사선감수성에 크게 의존되고 이러한 방사선감수성은 암환자 치료 후 국소재발을 예측하는데 이용될 수 있다고 보고되고 있다.<sup>4</sup> 방사선감수성에 대한 연구는 1956년 Puck와 Marcus<sup>5</sup>가 방사선조사 후 세포생존곡선을 작성하여 최초로 체외실험을 통해 시도하였으나 임상에는 이용되지 못하였다. 그 이후로 MTT분석과 집락형성능평가 등을 시행하여 얻은 방사선감수성이 치료 예측에 많은 도움이 된다고 알려져 있으며<sup>6</sup> 특히 2 Gy 방사선량에서의 세포생존률이 그 세포의 방사선감수성을 결정하는데 중요한 척도라고 알려져 있다.<sup>7</sup> 세포의 방사선감수성은 세포주기의 변화나 DNA 이중나선형 구조의 파괴와 연관되어 연구되고 있다.<sup>8,9</sup> 국내에서도 암세포주에서 방사선의 양과 분할조사에 따른 세포활성도 차이를 비교하였고<sup>10</sup> 암세포주의 방사선 및 항암제감수성에 대한 연구 등이 활발하다.<sup>11</sup>

방사선에 의한 세포사의 유형은 세포괴사와 programmed cell death(apoptosis)로 알려져 있으며 이 중 apoptosis는 각종 유전자의 발현과 발현산물인 단백질의 활성화로 일어나며,  $Ca^{2+}$ -dependent endonuclease 에 의하여 DNA가 분절되어 나타나는 DNA ladder를 특징적으로 나타낸다고 하였다.<sup>12,13</sup> Apoptosis의 발현은 정상이나 비정상적인 과정에서 조직의 형태와 모양을 조절하는 역할을 하고 세포의 복제와 세포사 간의 평형을 유지함으로써 조직의 지속적인 재생과 항상성을 유지하게 된다.<sup>14,15</sup> 1972년 Kerr 등<sup>15</sup>이

처음으로 apoptosis를 형태학적으로 연구한 이래로 apoptotic cell의 DNA 염색성의 감소를 이용한 flow cytometry법에 의한 apoptosis 정량 분석법이 시행되었다.<sup>16</sup> 각 세포들마다 apoptosis가 유발되는 방사선조사량이 다양하다는 것이 알려졌다<sup>17,18</sup> 방사선조사에 의한 apoptosis 유발 기전에 대한 연구도 활발하다.<sup>19,20</sup> 국내에서도 구강내 유포피암종세포주(KB)에 방사선을 조사하고 유세포분석을 한 결과 조사량에 비례해서 pre-G1 peak가 증가함을 보고하였으며<sup>21</sup> 방사선조사 후 KB 세포주의 칼슘농도 변화와 apoptosis 관계에 대하여 연구하였다.<sup>22</sup>

그러나 이전의 연구에서는 방사선에 민감하다고 알려진 암종세포주와 섬유모세포를 대상으로 방사선조사실험이 주로 행해졌으며 방사선조사시 2 Gy 이상의 조사량이 주로 사용되었다. 따라서 다양한 세포에 대한 방사선조사와 저선량 부분의 방사선조사량에 대한 연구의 필요성이 있었다. 본 연구에서는 인체의 상피기원 정상세포와 종양세포주, 간엽기원 정상세포와 종양세포주에 전리방사선을 조사한 후 세포활성도 변화와 apoptosis의 유발 여부를 관찰하여 방사선량에 따른 변화, 조사방법간의 차이, 각 세포 간의 비교, 방사선조사 1 일 후와 3 일 후의 세포활성도 변화, 세포활성도와 apoptosis 유발과의 상관관계를 알아보고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세포 및 세포배양

본 실험에서는 비종양성상피세포인 Rheem human epithelial keratinocytes(RHEK), 정상치은섬유모세포인 HGF-1, 구강내 유포피암종세포주인 KB, 인체 섬유육종세포주인 HT-1080을 사용하였다. RHEK, HGF-1, KB 세포주의 배지는 Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.) 10%와 Penicillin-Streptomycin 1%가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Media (Gibco

BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.)를 사용하였으며, HT-1080 세포주의 배지는 Fetal Bovine Serum (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.) 10%와 Penicillin-Streptomycin 1%가 첨가된 RPMI 1640 [Rosewell Park Memorial Institute (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.)]를 사용하였다. 세포배양기에서 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C 조건으로 배양하였다.

## 2. 방사선조사

각 세포에 방사선조사는 Cs-137 방사선조사기 (IBL 437C, France)로 실온에서 5.38 Gy/min의 선량율로 0.5, 1, 2, 4, 8 Gy를 단일 조사하였다. 또한 0.5, 1, 2, 4 Gy를 4 시간 간격으로 2 회 분할조사하여 총조사량이 각각 1, 2, 4, 8 Gy가 되도록 하였다. 방사선조사 1 일 후와 3 일 후에 세포활성도를 분석하고 방사선조사 1 일 후에 apoptosis를 측정하였다.

## 3. 세포활성도 분석

방사선조사 후 각 세포들의 세포활성도 측정을 위해 MTT 분석을 시행하였다. 4 well-dish의 각 well 당  $2.5 \times 10^4$  개의 세포를 넣은 후 1 일간 세포배양을 실시하고 방사선조사 1 일과 3 일 후에 MTT 분석을 시행하였다. 2 mg/ml 농도의 MTT 용액 (Sigma, St. Louis, U.S.A.)을 well 당 200  $\mu$ l를 첨가하고 4 시간 세포배양한 후 제거하였다. Formazan 결정을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 well 당 200  $\mu$ l를 첨가하였다. 흡광도 측정은 ELISA reader (Bio-tech Instruments Inc., Model EL308, U.S.A.)로 파장 550 nm에서 측정된 후 대조군에 대하여 실험군에서 생성된 formazan 결정의 흡광도를 다음과 같이 계산하여 세포활성도를 측정하였다.

$$\text{세포활성도} = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}$$

## 4. Apoptosis 측정

Apoptosis 측정을 위하여 세포를 2-well chamber slide (Nunc, U.S.A.)에서 1 일간 세포 배양을 시행하고 방사선조사 1 일 후에 ApopTag<sup>®</sup> Fluorescein kit (Intergen, U.S.A.)를 이용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 분석을 시행하였다. 세포를 10% paraformaldehyde에 10 분간 고정하고 70% 에탄올로 5 분간 고정하였으며 인산완충식염수로 5 분씩 2 회 수세 후 실온에서 potassium cacodylate가 함유된 equilibration buffer로 5 분간 작용시켰다. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 넣고 37°C에서 1 시간 배양하여 분절된 이중나선 DNA에 deoxyuridine triphosphate (dUTP)를 부착하고 수세 후 fluorescein detection solution을 첨가하여 실온에서 30 분간 배양하여 형광을 발현시킨 후 propidium iodide (PI)로 염색하여 대조도를 높였다. 마운트하고 공초점레이저주사현미경 (Bio-Rad, MRC 1024, U.S.A.)을 이용하여 DNA 분절을 확인하였다. 사용한 공초점레이저주사현미경은 Kr-Ar ion laser로서 15 mW를 이용하였으며 488 nm에서 여기하였다. 400 배로 확대한 화면에서 하나의 슬라이드에서 임의로 4 개의 화면을 선택하여 전체 세포수 당 형광을 내는 세포수의 비를 관찰하여 DNA 분절을 보여주는 세포의 비율을 측정하였다.

## 5. 통계처리

얻어진 결과는 SPSS 프로그램의 비모수통계법을 이용하여 통계처리하였다. 방사선조사량에 따른 변화, 조사방법의 비교, 각 세포군 간의 비교는 Kruskal-Wallis법과 Mann-Whitney법을 사용하였으며 방사선 조사 1 일 후와 3 일 후의 세포활성도의 비교는 Wilcoxon법을, 세포활성도와 apoptosis 유발과의 상관관계는 Spearman법을 사용하여 유의수준 0.05 수준에서 검정하였다.

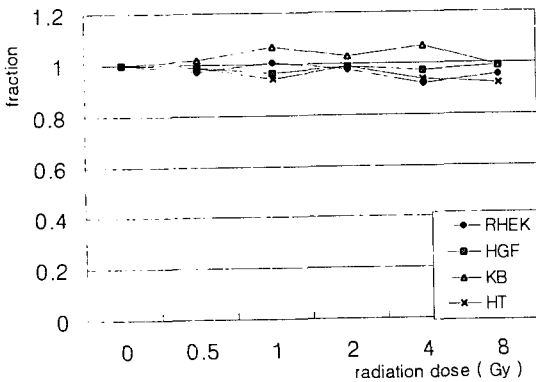
### III. 연구성적

#### 1. 방사선조사가 세포활성도에 미치는 영향

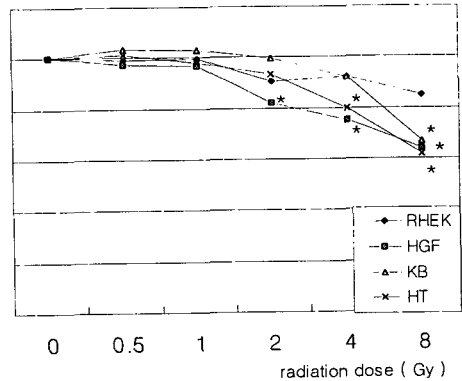
각 세포군에서 방사선조사 1일과 3일 후의 MTT 분석을 시행하여 세포활성도를 조사한 결과 1일 후의 세포활성도는 4 가지 세포 모두에서 조사량에 따른 세포활성도의 변화가 없었다( $p > 0.05$ ) (Fig. 1a). 방사선조사 3일 후 4 가지 세포 모두에서 조사량 증가에 따른 세포활성도의

감소양상을 보였으나 RHEK 세포에서는 통계적으로 유의한 차이는 없었고 HGF-1 세포는 2 Gy 이상에서, KB 세포주는 8 Gy에서, HT-1080 세포주는 4 Gy 이상에서 조사량 증가에 따라 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 1b).

정상세포와 종양세포주 간의 세포활성도를 비교하였을 때 RHEK 세포와 KB 세포주 간 세포활성도는 8 Gy 방사선조사 3일 후에 유의한 차이를 보였으나( $p < 0.05$ ) (Fig. 2a) HGF-1 세



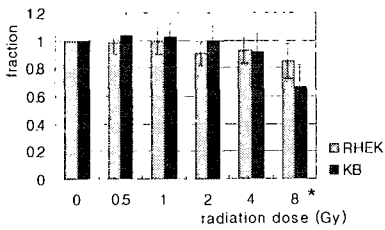
(a) 1 day after irradiation



\* : statistically significant with adjacent group

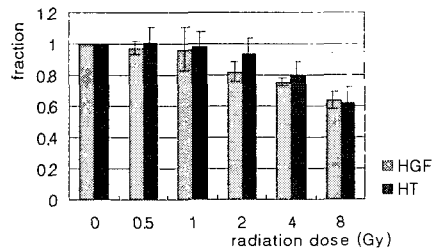
(b) 3 days after irradiation

Fig. 1. Determination of surviving fractions of cells with graded doses of radiation

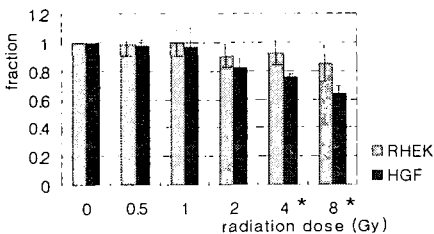


\* : statistically significant between RHEK and KB

(a) RHEK and KB

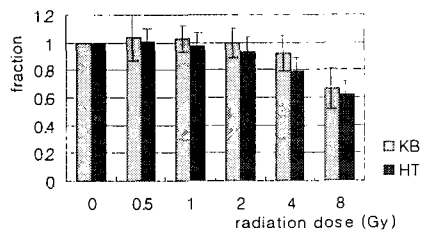


(b) HGF-1 and HT-1080



\* : statistically significant between RHEK and HGF-1

(c) RHEK and HGF-1



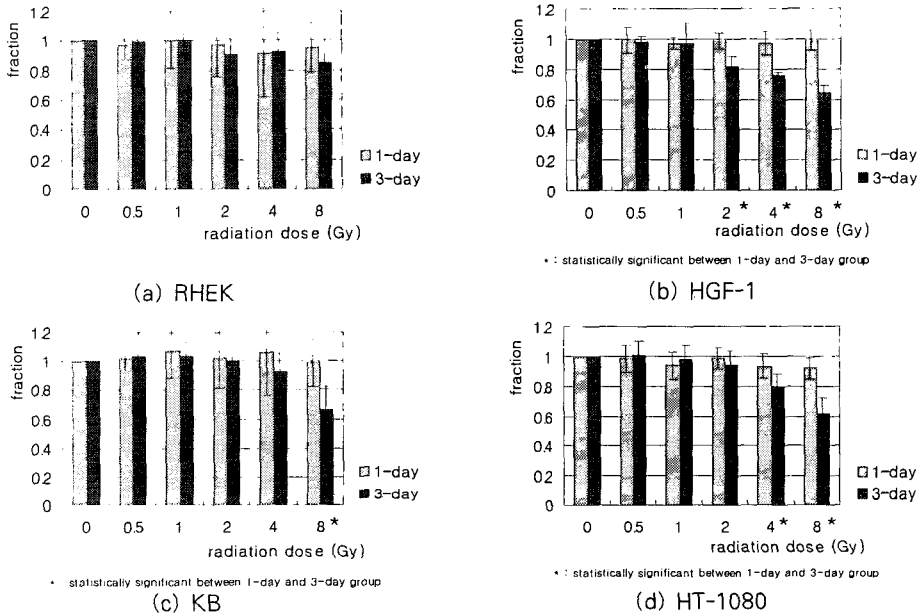
(d) KB and HT-1080

Fig. 2. Determination of surviving fractions of cells with graded doses of radiation in cells (3 days after irradiation)

포와 HT-1080 세포주 간에는 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ )(Fig. 2b). 상피기원 세포와 간엽기원 세포 간의 세포활성도를 비교하였을 때 RHEK 세포와 HGF-1 세포 간에는 4 Gy와 8 Gy 방사선조사 3 일 후에 세포활성도에서 유의한 차이를 보였으나( $p < 0.05$ )(Fig. 2c) KB 세포

주와 HT-1080 세포주 간에는 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ )(Fig. 2d).

방사선조사 1 일 후와 3 일 후의 세포활성도 비교시 HGF-1 세포는 2 Gy 이상에서, HT-1080 세포주는 4 Gy 이상에서, KB 세포는 8 Gy 조사시 3 일 군의 세포활성도는 1 일군에 비



**Fig. 3.** Determination of surviving fractions of cells with graded doses of radiation in 1-day and 3-day group

**Table 1.** Determination of surviving fractions of cells by single and split irradiation ( 1 day after irradiation )

group	dose (Gy)		1		2		4		8	
	single	split	single	split	single	split	single	split	single	split
RHEK	1.005*	1.047	0.975	0.959	0.918	0.951	0.954	0.972		
	$\pm 0.087$	$\pm 0.193$	$\pm 0.084$	$\pm 0.116$	$\pm 0.085$	$\pm 0.104$	$\pm 0.068$	$\pm 0.083$		
HGF-1	0.967	0.946	0.985	1.023	0.971	0.904	0.989	0.983		
	$\pm 0.040$	$\pm 0.055$	$\pm 0.050$	$\pm 0.134$	$\pm 0.074$	$\pm 0.109$	$\pm 0.067$	$\pm 0.086$		
KB	1.070	1.051	1.026	0.979	1.065	0.967	0.990	1.013		
	$\pm 0.193$	$\pm 0.139$	$\pm 0.216$	$\pm 0.174$	$\pm 0.298$	$\pm 0.101$	$\pm 0.163$	$\pm 0.154$		
HT-1080	0.940	0.913	0.986	0.960	0.934	0.874	0.918	0.863		
	$\pm 0.091$	$\pm 0.123$	$\pm 0.074$	$\pm 0.076$	$\pm 0.081$	$\pm 0.106$	$\pm 0.073$	$\pm 0.061$		

\* : Average value and standard deviation were calculated from 6 independent experiments.

**Table 2.** Determinations of surviving fractions of cells by single and split irradiation ( 3 days after irradiation )

group	dose (Gy)		1		2		4		8	
	single	split	single	split	single	split	single	split	single	split
RHEK	0.998*	0.938	0.906	0.931	0.925	0.917	0.850	0.833		
	±0.098	±0.157	±0.080	±0.093	±0.089	±0.131	±0.124	±0.083		
HGF-1	0.966	0.884	0.820	0.843	0.754	0.737	0.639	0.627		
	±0.137	±0.058	±0.062	±0.061	±0.024	±0.044	±0.056	±0.055		
KB	1.029	1.009	0.999	0.944	0.923	0.904	0.666	0.693		
	±0.098	±0.161	±0.108	±0.117	±0.126	±0.117	±0.153	±0.073		
HT-1080	0.977	0.996	0.936	0.954	0.797	0.837	0.619	0.651		
	±0.099	±0.088	±0.098	±0.098	±0.088	±0.068	±0.101	±0.101		

\* : Average value and standard deviation were calculated from 6 independent experiments.

**Table 3.** Effect of different graded doses of radiation on the induction of apoptosis ( % )

group	dose(Gy)						
	0	0.5	1	2	4	8	
RHEK	0	0	0	0	0	0.22	±0.35
HGF-1	0	0	0	0	0	0.04	±0.08
KB	2.19*	2.76	2.57	3.51	4.79**	5.68**	
	±0.44	±0.51	±0.55	±1.04	±0.85	±0.71	
HT-1080	0	0	0	0	0.06	0.17	
					±0.09	±0.16	

\* : Average value and standard deviation were calculated from 5 independent experiments.

\*\* : statistically significant with adjacent groups

해 세포활성도가 유의하게 감소하였으나( $p < 0.05$ )(Fig. 3b, 3c, 3d) RHEK 세포에서는 유의한 차이는 없었다( $p > 0.05$ )(Fig. 3a).

단일조사와 분할조사에 따른 세포활성도 차이는 4 가지 세포 모두에서 큰 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ )(Table 1, 2).

## 2. 방사선조사가 apoptosis 유발에 미치는 영향

KB 세포주에서 방사선조사를 하지 않은 대

조군의 apoptosis 유발율은 2%이었으나 조사선량 증가에 따라 apoptosis 유발율도 증가하였으며 4 Gy와 8 Gy 조사시 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). RHEK, HGF-1, HT-1080 세포주에서는 apoptosis 유발이 거의 일어나지 않았다(Table 3). 단일조사와 분할조사에 따른 apoptosis 유발의 차이는 없었으며( $p > 0.05$ )(Table 4) 세포활성도와 apoptosis 유발 간에도 연관성이 없었다.

Table 4. Effect of single and split irradiation on the induction of apoptosis (%)

group	1		2		4		8	
	single	split	single	split	single	split	single	split
RHEK	0	0	0	0	0	0	0.22 ±0.35	0.09 ±0.19
HGF-1	0	0	0	0	0	0	0.04 ±0.08	0
KB	2.57* ±0.55	2.50 ±0.53	3.51 ±1.04	3.42 ±0.37	4.79 ±0.85	4.21 ±0.41	5.68 ±0.71	5.87 ±0.93
HT-1080	0	0	0	0	0.06 ±0.09	0.02 ±0.05	0.17 ±0.16	0.22 ±0.36

\* : Average value and standard deviation were calculated from 5 independent experiments.

#### IV. 총괄 및 고안

일반적으로 방사선감수성에 대한 고전적 의미의 Bergonie-Tribondeau의 법칙<sup>23</sup>은 오래 전부터 잘 알려져 왔다. 즉 조직의 재생능력이 클수록, 세포분열기간이 짧을수록, 형태적으로나 기능적으로 미분화일수록, 분열능이 왕성하고 분화도가 낮은 세포일수록 방사선감수성이 높다는 것이다. 그러나 이런 단편적인 이론으로는 각종 종양세포의 구체적인 방사선감수성의 측정이 불가능하다. 현재에는 거의 모든 종양세포에 대한 세포배양이 가능하게 되어 세포의 생존능력을 객관적으로 평가한 생존곡선이 방사선감수성을 측정하는데 이용되고 있으며 방사선에 의한 DNA 손상 회복능력의 차이가 방사선감수성을 결정하는 중요한 기전임이 보고되고 있다<sup>24</sup>. 재현성이 높은 정량분석법인 MTT 분석법은 많은 시료를 간단하고 빠르게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있다<sup>25,26</sup>. MTT 분석법은 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용되지만 방사선감수성 검사법, 성장인자감수성 실험 등에도 많이 사용되고 있다<sup>27,28</sup>.

일반적으로 세포에 대한 방사선조사는 일시

적인 세포주기의 정지와 복구할 수 없는 상해에 의한 세포사를 일으킨다고 알려져 있다<sup>29</sup>. 각 세포의 종류와 특성에 따라 차이는 있지만 정상배양상태의 세포는 일정한 분획의 세포주기를 유지하나 세포가 전리방사선, 자외선, 기타 DNA에 상해를 주는 외부요인에 노출되면 세포주기가 길어진다. G1기 arrest나 S기 delay는 방사선 조사량이 많아야 일어나는데 반해 G2기 arrest는 1 Gy에서 10 Gy 정도의 조사량으로도 일어나며 이러한 현상은 방사선량이 많을수록 길어지게 되는데<sup>30</sup> 이는 손상받은 DNA 복구에 필요한 시간이 많이 요구되기 때문인 것으로 설명된다<sup>31</sup>.

세포사는 세포괴사와 programmed cell death(apoptosis)로 분류할 수 있으며 이러한 두 가지 유형의 세포사의 형태학적 변화는 전자현미경과 광학현미경으로 관찰이 가능하다<sup>32</sup>. Apoptosis의 형태학적 변화로는 초기에는 염색질의 농축, 핵막의 변화와 세포질의 위축 등이 관찰되나 세포내 소기관들은 정상형태를 유지하며 더욱 진행시에 핵의 분할 및 세포질의 위축으로 apoptotic body가 생기고 궁극적으로 이들은 거식세포에 흡입된다<sup>33</sup>. Apoptosis의 유발 요인으로는 여러 가지를 들 수 있는데 후천성면역결핍증이나 알츠하이머병 등에서 apoptosis가 증가

되고<sup>34</sup> transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), 열, 종양억제제 중 일부도 apoptosis를 유발시키는 것으로 알려져 있으며<sup>35-37</sup> 전리방사선, 종양괴사물질, 항암제로 처리하였을 경우에도 apoptosis가 일어날 수 있다<sup>20,38,39</sup>. 방사선에 의해 apoptosis가 일어나는 기전은 완전히 밝혀져 있지 않고 여러 요소들이 복합적으로 작용하는 것으로 이해되고 있는데 기본적으로는 방사선이 세포의 DNA와 지질막에 손상을 주게 되고<sup>40</sup> 이것이 신호가 되어 종양유전자와 종양억제유전자에 영향을 미치고 세포내 칼슘이온의 농도를 증가시키게 되며 세포내 칼슘이온의 증가가 bcl-2 유전자에 영향을 미쳐 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>41</sup>. 또한 방사선조사에 의한 apoptosis는 DNA 이중나선구조의 파괴와 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 apoptosis에 관여한다고 알려진 sphingomyelin 신호전달경로의 sphingomyelin이 방사선조사에 의하여 ceramide로 분해된 후 stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase cascade를 활성화하여 apoptosis를 유도한다고 하였다<sup>20,42,43</sup>.

방사선조사에 의해 유발되는 apoptosis는 수 시간 내에 일어난다는 여러 연구가 있어<sup>22,44,45</sup> 본 실험에서도 방사선 조사 1 일 후 apoptosis 유발을 관찰하였다. 방사선감수성은 세포의 내재적 감수성의 차이 외에 조직의 국소적인 산소분압, 방사선 조사시 주위온도, pH 조건 등 주위 환경 요인과 밀접한 연관을 가지고 있어<sup>46,49</sup> 내재적 방사선감수성을 조사할 때는 일정한 조건들이 주어져야 한다. 본 실험에서는 방사선 조사 전 배양용기에 일정시간 동안 배양 후 실온에서 방사선을 조사하였다. 많은 연구자들이 산성환경이 apoptosis를 유발한다고 보고하였지만<sup>50,51</sup> 방사선에 의한 apoptosis는 산성환경에서 apoptosis의 유발을 억제한다는 보고가 있다<sup>48,49</sup>. 본 실험에서는 세포주의 배지를 pH 7.2-7.4 조건으로 사용하여 방사선조사에 의한 apoptosis 유발을 관찰하였다. 조사방사선 선량율에 관한 여러 연구

에서 고선량을 조사시 저선량율에 비해 DNA 손상이 더욱 크고 회복도 늦었다고 하였으며<sup>52,53</sup> 본 실험에서는 5.38 Gy/min의 고선량율로 단일조사와 분할조사를 시행하였다.

저선량의 방사선에 의하여 G2기 세포에서 약간의 분열지연이 야기되며 분열지연된 세포는 계속적으로 세포분열의 지연이 증가되고 다른 분열지연되지 않은 세포는 세포분열을 하게 된다. 따라서 방사선조사 후 세포활성도 변화를 관찰하려면 충분한 시간이 경과되어야 한다. KB 세포주에서 방사선조사 후 시간에 따른 세포활성도의 연구에서 4 시간과 1 일 후에는 대조군과 차이를 보이지 않다가 3 일 후에 대조군과 유의한 차이를 보였다고 하였다<sup>22</sup>. 본 실험에서도 방사선 조사 1 일 후에는 4 가지 세포주 모두에서 조사량에 따른 세포활성도의 변화가 없었으나 3 일 후에는 HGF-1 세포는 2 Gy 이상에서, KB 세포주는 8 Gy에서, HT-1080 세포주는 4 Gy 이상에서 세포활성도가 감소하였고 시간경과에 따른 세포활성도 비교시 HGF-1 세포는 2 Gy 이상에서, KB 세포주는 8 Gy에서, HT-1080 세포주는 4 Gy 이상에서 3 일군이 1 일군에 비해 세포활성도가 감소하였다.

일반적으로 종양세포주가 정상세포에 비해 방사선감수성이 높고 상피세포가 간엽세포에 비해 방사선감수성이 높다고 알려져 있으나 정상섬유모세포가 암종세포주보다 방사선에 민감하다는 보고<sup>54</sup>가 있고 인체의 연조직육종세포주와 유방암종세포주의 방사선감수성 비교시 차이가 없었다는 연구<sup>55</sup> 등이 있다. 또한 여러 연구들에서 방사선 조사대상 세포들의 종류와 상태에 따라 apoptosis를 일으키는 방사선 조사량은 다양하다고 보고되고 있다<sup>17,18,21,56</sup>. 본 실험에서는 각 세포 간 비교시 RHEK 세포와 KB 세포주 간에는 8 Gy 조사 3 일 후에, RHEK 세포와 HGF-1 세포 간에는 4 Gy와 8 Gy 조사 3 일 후에 세포활성도에서 유의한 차이를 보였으나 HGF-1 세포와 HT-1080 세포주 간이나 KB 세포주와 HT-1080 세포주 간의 세포활성도에서는 유의한 차



이를 보이지 않았다. 또한 apoptosis의 유발은 RHEK, HGF-1, HT-1080 세포주에서는 관찰되지 않고 KB 세포주에서만 관찰되었으며 4 Gy와 8 Gy에서 방사선조사시 유의하게 증가하였으나 세포활성도와 apoptosis 유발 간의 연관성은 없었다. 공초점레이저주사현미경은 정교한 레이저 광원을 초점으로 이용하여 관심층의 얇은 단면상을 얻을 수 있다. Apoptosis 유발을 측정하기 위해서는 일정한 기준면이 필요하여 본 실험에서는 일정하게 반복가능한 slide 바닥면을 기준으로 삼았다. KB 세포주에서 apoptosis가 일어난 세포들은 apoptosis가 일어나지 않는 세포들에 의해 바닥면에서 밀리는 형태를 보여 핵의 중심부가 관찰되지 않고 세포의 변연이 관찰되었다.

방사선조사방법에 대한 연구로 단일조사와 분할조사시 방사선 생물학적 효과에 큰 차이가 있다는 점에 대하여 이론적인 근거가 제시된<sup>57</sup> 후 분할조사는 방사선치료의 주 방법으로 이용되어 왔다. 분할조사시 방사선 생물학적 이점은 분할조사 간격 내에 일어나는 조직세포 준치사손상의 회복이 정상조직에서 더 현저하다는 점과 세포분열 과정에서의 재분포(redistribution), 재군집화(repopulation)와 종양조직에서 일어나는 재산소화(reoxygenation)가 방사선 효과를 높여준다는 점이다<sup>58</sup>. 분할조사시는 손상의 회복으로 인해 방사선감수성이 낮아진다고 생각되나 방사선에 의한 손상의 회복 정도는 분할조사 시간의 간격, 선량을, 횟수 등에 따라 다양하다<sup>58</sup>. 마우스 공장세포 및 대부분의 인체장기에서 방사선조사 후 4시간 이내에 준치사손상의 회복이 일어나는 것은 이미 실험적으로 증명된 바 있어<sup>59,60</sup> 본 실험에서도 이에 근거하여 분할조사간격을 4시간으로 하여 2회 조사하였으나 4가지 세포 모두에서 조사방법에 따른 세포활성도와 apoptosis 유발의 차이는 보이지 않았다. 이전 방사선조사방법의 연구에서는 분할조사가 5회 이상인 다중분할조사법(multi-fractionated irradiation)을 주로 사용하였으며 조사조건과 세포 종류에 따라 다양한

반응을 보였다<sup>61-63</sup>. 마우스 공장소낭선세포에서 단일조사와 2회 분할조사시 평균치사선량에 유의한 차이가 없었다는 보고<sup>64</sup>와 마우스 전신에 다중분할조사 후 공장소낭선세포측정에서 분할횟수가 증가함에 따라 생존곡선이 고선량으로 이동하고 경사도가 점차 낮아진다는 연구<sup>65</sup> 등도 있어 다양한 반응성을 보이고 있다.

본 실험에서는 방사선조사 후 세포활성도와 apoptosis 만을 측정하였으나 시간경과에 따른 apoptosis 유발과 세포주기변화와의 관계 등에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

## 참고문헌

1. Brenner DJ, Ward JF. Constrains on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 1992; 61:737-748.
2. Radford IR. The level of induced DNA double-strand breakage correlates with cell killing after X-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1985;48:45-54.
3. Malaise EP, Fertil B, Deschavanne PJ, Chavaudra N, Brock WA. Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumor cells and fibroblasts. *Radiat Res* 1987;111:319-333.
4. Weichselbaum RR, Epstein J, Little JB, Kornblith PL. In vitro cellular radiosensitivity of human malignant tumors. *Eur J Cancer* 1976;12:47-51.
5. Puck TT, Marcus PI. Action of X-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 1956; 103:653-666.
6. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 1987;47:943-946.
7. Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The

- radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 1984; 2:317-323.
8. DeWeese TL, Shipman JM, Dillehay LE, Nelson WG. Sensitivity of human prostatic carcinoma cell lines to low dose rate radiation exposure. *J Urol* 1998;159:591-598.
  9. Polischouk AG, Cedervall B, Ljungquist S, Flygare J, Hellgren D, Grenman R, Lewensohn R. DNA double-strand break repair, DNA-PK, and DNA ligases in two human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43:191-198.
  10. 이삼선, 유동수. 수종의 암세포주와 치은섬유아세포에서 방사선의 양과 분할조사에 따른 세포활성도와 독성의 변화에 관한 연구. *치과방사선* 1997;27:107-122.
  11. 홍성우, 최은숙, 고광준. A-431 세포주의 방사선 및 항암제의 감수성에 관한 실험적 연구. *치과방사선* 1999;29:327-339.
  12. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
  13. Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;18:137-153.
  14. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991;65:1097-1098.
  15. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
  16. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
  17. Kubota Y, Takahashi S, Sato H. Effect of gamma-irradiation on function and viability of alveolar macrophages in mouse and rat. *Int J Radiat Biol* 1994;65:335-344.
  18. Delic J, Magdelenat H, Barbaroux C, Chaillet MP, Dubray B, Gluckman E, Fourquet A, Girinsky T, Cosset JM. In vivo induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *Br J Radiol* 1995; 68:997-1003.
  19. Radford IR, Aldridge DR. Importance of DNA damage in the induction of apoptosis by ionizing radiation: effect of the scid mutation and DNA ploidy on the radiosensitivity of murine lymphoid cell lines. *Int J Radiat Biol* 1999;75: 143-153.
  20. Kolesnick RN, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z. The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation. *Biochem Cell Biol* 1994;72:471-474.
  21. 박무순, 이삼선, 최순철, 박태원, 유동수. 인체의 암세포주와 치은섬유모세포주에서 방사선조사가 apoptosis 유발에 미치는 영향에 관한 연구. *치과방사선* 1998;28:59-72.
  22. 문재운, 이삼선, 허민석, 최순철, 박태원, 유동수. 방사선조사후 유평피암종세포내 칼슘농도의 변화와 apoptosis 발현에 관한 연구. *치과방사선* 1999;29:105-117.
  23. Bergonie J, Tribondeau L: *Radiat Res* 11:587, 1959 translation by Fletcher GH of paper originally published in *Comptes Rendus Seandes Acad Sci* 1906:143:983.
  24. Weichselbaum RR, Little JB. Radio-resistance in some human tumor cells conferred in vitro by repair of potentially lethal X-ray damage. *Radiology* 1982; 145:511-513.
  25. Klumper E, Pieters R, Kaspers GJ, Huismans DR, Loonen AH, Rottier MM, van Wering ER, van der Does-van den Berg A, Hahlen K, Creutzig U. In vitro chemosensitivity assessed with the MTT assay in childhood acute non-lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995;9: 1864-1869.
  26. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM,

- Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 1987;47: 5875-5879.
27. Hida T, Ueda R, Takahashi T, Watanabe H, Kato T, Suyama M, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T. Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a newly developed 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) hybrid assay. *Cancer Res* 1989;49:4785-4790.
  28. Kim WS, Park C, Jung YS, Kim HS, Han J, Park CH, Kim K, Kim J, Shim YM, Park K. Reduced transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-beta RII) expression in adeno-carcinoma of the lung. *Anticancer Res* 1999;19:301-306.
  29. Yarnold J. Molecular aspect of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997;44:1-7.
  30. Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 1995;6:63-72.
  31. Maity A, Mckenna WG, Muschel RJ. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation : a review. *Radiother Oncol* 1994;31:1-13.
  32. Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S, Seito T. Radiation-induced apoptotic cell death in human gastric epithelial tumour cells: correlation between mitotic death and apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1995;67:677-685.
  33. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
  34. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
  35. Sellins KS, Cohen JJ. Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. *Radiat Res* 1991;126:88-95.
  36. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 1993;82:15-21.
  37. Haufel T, Dormann S, Hanusch J, Schwieger A, Bauer G. Three distinct roles for TGF-beta during inter-cellular induction of apoptosis : a review. *Anticancer Res* 1999;19:105-111.
  38. Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 1989;49: 5870-5878.
  39. Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer* 1991;64: 192-196.
  40. El-Mofty SK, Kahn AJ. Early membrane injury in lethally irradiated salivary gland cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1981;39: 55-62.
  41. Voehringer DW, Story MD, O'Neil RG, Meyn RE. Modulating Ca<sup>2+</sup> in radiation-induced apoptosis suppresses DNA fragmentation but does not enhance clonogenic survival. *Int J Radiat Biol* 1997;71:237-243.
  42. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988;35:95-125.
  43. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994; 180:525-535.
  44. Langley RE, Palayoor ST, Coleman CN, Bump EA. Radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Int J Radiat Biol*

- 1994;65:605-610.
45. Arai S, Kowada T, Takehana K, Miyoshi K, Nakanishi YH, Hayashi M. Apoptosis in the chicken bursa of fabricius induced by X-irradiation. *J Vet Med Sci* 1996;58:1001-1006.
  46. Konings AWT. Effects of heat and radiation on mammalian cells. *Radiat Phys Chem* 1987;30:339-349.
  47. Yao KS, Clayton M, O' Dwyer PJ. Apoptosis in human adenocarcinoma HT29 cells induced by exposure to hypoxia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87: 117-122.
  48. Lee HS, Park HJ, Lyons JC, Griffin RJ, Auger EA, Song CW. Radiation-induced apoptosis in different pH environments in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38: 1079-1087.
  49. 이형식, 박홍규, 허원주, 서수영, 이상화, 정민호, 박헌주, 송창원. SCK 선암 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포 주기. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 1998;16:91-98.
  50. Li J, Eastman A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the Na(+)/H(+)-antiport. *J Biol Chem* 1995;270:3203-3211.
  51. Park HJ, Makepeace CM, Lyons JC, Song CW. Effect of intracellular acidity and ionomycin on apoptosis in HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1996;32:540-546.
  52. Hu Q, Hill RP. Radiosensitivity, apoptosis and repair of DNA double-strand breaks in radiation-sensitive Chinese hamster ovary cell mutants treated at different dose rates. *Radiat Res* 1996;146:636-645.
  53. Wilkins RC, Ng CE, Raaphorst GP. Comparison of high dose rate, low dose rate, and high dose rate fractionated radiation for optimizing differences in radiosensitivities in vitro. *Radiat Oncol Investig* 1998;6: 209-215.
  54. Malaise EP, Deschavanne PJ, Fertil B. The relationship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells. *Int J Radiat Biol* 1989; 56:597-604.
  55. Ruka W, Taghian A, Gioioso D, Fletcher JA, Preffer F, Suit HD. Comparison between the in vitro intrinsic radiation sensitivity of human soft tissue sarcoma and breast cancer cell lines. *J Surg Oncol* 1996;61:290-294.
  56. Stapper NJ, Stuschke M, Sak A, Stuben G. Radiation-induced apoptosis in human sarcoma and glioma cell lines. *Int J Cancer* 1995;62:58-62.
  57. Regaud C. The influence of the duration of irradiation on the changes produced in the testicle by radium. *Compt Rend Soc Biol* 86:787-789, 1922, translated by Archambeau Jo, Del Regato JA. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1977;2:565-567.
  58. Suit HD. Consideration of fractionation schedules for radiation dose. *Radiology* 1972;105:151-156.
  59. Elkind MM, Sutton HA. X-ray damage and recovery in mammalian cell in culture. *Nature* 1959;184:1293-1295.
  60. Elkind MM, Sutton HA. Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1990; 13:556-593.
  61. Taylor YC, Brown JM. Radio-sensitization in multifraction schedules. I. Evidence for an extremely low oxygen enhancement ratio. *Radiat Res* 1987;112:124-133.
  62. Jen YM, Hendry JH. Acute response of mouse kidney clonogens to fractionated irradiation in situ and then assayed in primary culture. *Br J Radiol* 1991;64:142-148.
  63. Werts FD, Burholt DR, Paljug WR, Polizotto SL, Yann VM. Radiation survival of two human cervical carcinoma cell lines after multifraction irradiation. *Int J Radiat*

Oncol Biol Phys 1996;35:941-950.

64. 고병희, 함창곡, 김정진, 박찬일. 단일조사와 분할 조사시 마우스 공장소낭선세포의 방사선효과에 관한 실험적 연구. J Korean Soc Ther Radiol 1985;3:1-8.
65. 홍성언, 안치열. 다분할조사에 의한 마우스공장소 낭선 세포의 선량반응곡선. J Korean Soc Ther Radiol 1986;4:89-97.

Address : Prof. In-Woo Park, Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kangnung National University, San 123, Chibyun-Dong, Kangnung City, Kangwon-Do, 210-702, Korea.  
Tel : 0391) 640-3187, 3135 Fax : 0391) 640-3113  
E-mail : xraypark@knusun.kangnung.ac.kr

## 사진부도 설명

- Fig. 4.** Irradiated RHEK cells ( $\times 400$ , 8 Gy irradiation )  
There is no fluorescent cell.  
The normal cells were counter-stained with PI.
- Fig. 5.** Irradiated HGF-1 cells ( $\times 400$ , 8 Gy irradiation )  
There is no fluorescent cell.  
The normal cells were counter-stained with PI.
- Fig. 6.** Irradiated KB cells ( $\times 400$ , 8 Gy irradiation )  
There are some fluorescent cells .  
The cells were counter-stained with PI to quantitate the incorporation of dNTP.
- Fig. 7.** Irradiated HT-1080 cells ( $\times 400$ , 8 Gy irradiation )  
There is no fluorescent cell.  
The normal cells were counter-stained with PI.

사진부도

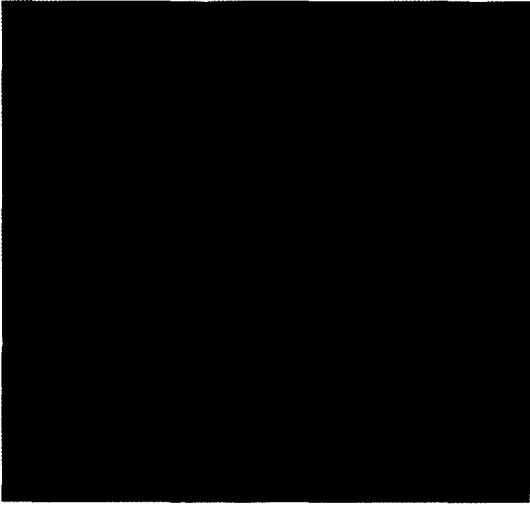


Fig 4

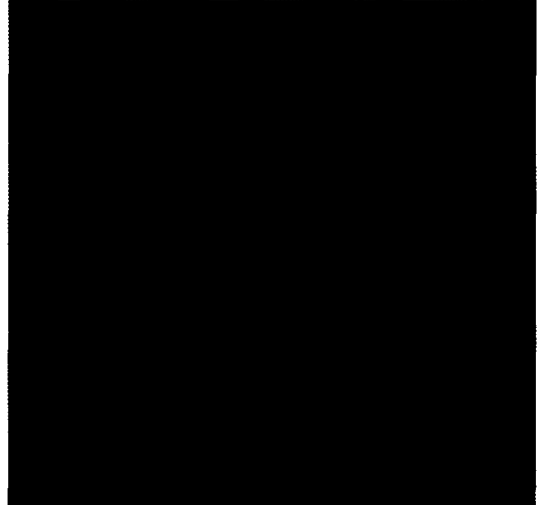


Fig 5

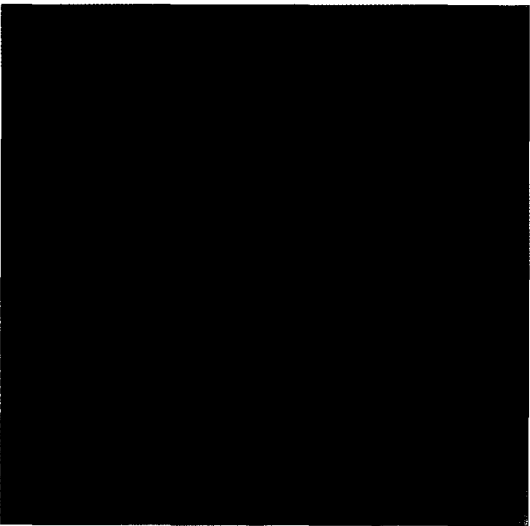


Fig 6



Fig 7