

18) 방사선에 의한 제대 혈관내피세포의 apoptosis와 Basic Fibroblast Growth Factor의 억제 효과

서해대학 방사선과¹, 군산대학교 자연과학대학 화학과²
이송재¹, 장재철²

Basic Fibroblast Growth Factor(bFGF) Inhibits Radiation-induced Apoptosis on Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVECs)

Song Jae Lee¹ · Jae Chul Chang²

¹ Department of Radiotechnology, Sohae College,

² Department of Chemistry, Kunsan National University

Abstract

The response of endothelial cells to ionizing radiation is thought to be an important factor in the overall response of normal tissue. It has been reported that basic fibroblast growth factor (bFGF), a potent mitogen for endothelial cells, protects endothelial cells obtained from various tissue such as porcine and bovine from radiation-induced apoptosis in vitro. We studied the apoptotic response of confluent monolayers of the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to ionizing radiation and the effects of bFGF. Apoptosis was assessed by identifying changes in nuclear morphology, recording floating cells and adherent cells rates and Sytox green nucleic acid staining. Irradiation (1-10Gy) induces apoptosis in a dose- and time-dependent manner. But, radiation-induced apoptosis is inhibited in cultures that are continuously added of bFGF. For example, 24 h after 10Gy, 29.2% of cells in the monolayer deprived of bFGF exhibit apoptotic morphology compared with 13.3% in the presence of bFGF(10 ng/ml). This study show that either deprived of bFGF or irradiation can induce apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and that radiation-induced apoptosis can be modified by added of bFGF.

I. 서론

구조와 기능에 따라 모세혈관과 동맥 및 정맥으로 구분되는 혈관은 여러 가지 구성 세포로 되어있는데, 혈관 가장 안쪽에 단층의 세포층을 형성하고 있는 혈관내피세포는 혈관조직의 항상성, 혈액 응고, blood-tissue exchange, 정상조직 혹은 종양조직내 신생혈관 생성 등의 다양한 생리적인 반응이나 질병의 진행과 관련된 수 많은 기능을 수행한다(1). 또한, 혈관내피세포는 혈장과 혈액 구성 세포들과 직접 접촉하며, 독소나 약물 등과 같은 여러 가지 외부물질의 표적이 된다(2, 3). 혈관내피세포의 이같은 중요성은 많은 연구자들로 하여금 실험동물을 이용한 in vivo 실험(4), 여러 장기 또는 조직으로부터 분리된 혈관내피세포를 이용한 in vitro 실험(5) 등을 진행하게 한 주된 요인이다.

혈관내피세포는 위치해있는 장기와 조직에 따라 그 특성이 서로 다르다는 사실은 많은 연구자들에 의해서 시사되어온 바다. 따라서 각종 자극에 대한 혈관내피세포의 반응성을 탐구해온 많은 연구자는 그 목적에 따라 여러 장기와 조직으로부터 혈관내피세포를 분리하여 사용하였으며, 당연히 같은 약물에 대해서도 서로 다른 조직의 혈관내피에 적용하는 실험을 진행하고 있다(6).

세포에 대한 방사선 조사는 일반적으로 일시적인 세포주기의 정지와 DNA 손상복구의 증가 그리고 복구할 수 없는 손상에 의한 세포의 사멸을 유도한다(7, 8). 세포의 사멸은 necrosis와 programmed cell death (apoptosis)로 분류할 수 있으며, 이중 apoptosis가 일어나는 동안의 세포의 형태적 생리적 특징은 세포막 박리, 세포의 수축, 핵의 응축, DNA의 분절, 세포막을 이루는 인지질 일부의 세포 외부로의 노출 등이 있다(9).

최근에 많은 연구자들이 혈관내피세포에 방사선을 조사한 in vivo(10)와 in vitro(3) 실험에서 apoptosis가 유도됨을 보고하였으며, 혈관내피세포에서 방사선에 의해 유도된 apoptosis는 vascular endothelial growth factor(VEGF)등과 같은 growth factor와

endothelin-1과 같은 cytokine에 의해 억제됨을 보고하였다(11, 12). Fuks 등은(13)(1994) 소의 동맥에서 혈관내피세포를, Langley 등은(9)(1997) 소의 부신에서 미세혈관 내피세포를 분리한 후 방사선을 조사하여 apoptosis가 유도된다는 사실을 보고하였고, 혈관내피세포의 강력한 증식인자인 basic fibroblast growth factor(bFGF)가 apoptosis를 억제한다고 보고하였다. Kwak 등은(14)(1999) 사람의 제대정맥(human umbilical cords)으로부터 혈관내피세포를 분리한 후 혈청 무첨가 상태에서 apoptosis를 유도하고, 이와 같은 apoptosis는 VEGF등과 같은 growth factor에 의해 차단된다고 보고하였다.

본 연구는 방사선 조사에 의하여 human umbilical vein endothelial cells(HUVECs)에서 apoptosis가 일어나는지, 소의 혈관내피세포의 경우에서와 마찬가지로 이와 같은 apoptosis가 증식인자의 일종인 bFGF에 의해 억제되는지의 여부를 확인하기 위해 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포의 분리 및 배양

사람 제대 정맥으로부터 혈관 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)를 콜라젠 효소를 처리하여 분리하였고, 분리된 세포를 면역형광 검출방법(factor VIII)을 이용하여 혈관 내피세포임을 확인하였다(>95% positive) (15). 분리된 혈관내피세포는 M-199 배양액에 20% 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)를 첨가하여, 37°C-5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 본 실험에 사용된 HUVEC은 세대 배양 중인 2-4대째의 배양 세포였다.

2. 혈관내피세포의 Apoptosis의 유도

혈관내피세포는 젤라틴을 도포한 24-well plates(5 × 10⁴ cells/well)에 20% FBS를 첨가한 M-199 배양액에서 24시간 동안 배양하였다.

혈관내피세포의 apoptosis를 유도하기 위하여 선형 가속장치(Simens, 6MV X-ray, 200 cGy/min)를 이용하여 방사선을 조사하였다. 균일한 선량분포를 얻기 위해 1cm 두께의 bolus를 사용하였다. 24시간 배양된 혈관내피세포는 방사선 조사하기 30분전과 직후에 5% FBS가 함유된 신선한 배양액으로 교환하였다.

3. Apoptosis의 정량적 결정

방사선으로 조사한 혈관내피세포의 apoptosis는 다음과 같은 방법으로 측정하였다(14). 24-well plate내의 부유세포를 두 번의 PBS로 씻은 후 수집하였고, 바닥에 부착된 세포는 trypsin를 이용하여 수집하였다. 부유세포와 부착세포의 수는 Coulter Model Z1 Dual Counter System로 측정하였다. 배양용기 바닥에 부착된 세포들 중 apoptosis를 측정하기 위하여, 세포가 들어 있는 배양용기를 0.9% sodium chloride로 씻고 0.5% glutaraldehyde로 15분동안 고정한 후, Sytox green으로 세포핵을 염색하였다. apoptosis가 일어난 세포를 2명이 각각 4곳을 임의로 선정하여 형광현미경(Zeiss)으로 수를 측정하였다.

4. Basic Fibroblast Growth Factor의 투여

배양된 혈관내피세포에 방사선 조사 30분전에 bFGF로 전처리하고 방사선을 조사하였으며, 방사선 조사 직후 bFGF가 포함된 신선한 배양액으로 교환하였다.

5. 통계

각 실험군에서 apoptosis 발생 백분율을 unpaired Student's t-test로 검증하여 95%의 신뢰구간에서 유의성을 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

전리방사선으로 배양 혈관내피세포의 apoptosis를 유도하기 위해 여러 가지 선량(1, 5, 10, 15Gy)으로 배양세포에 방사선을 조사하고, 방사선 조사 후 시간 변화(12, 24, 48, 72 h)에 따른 혈관내피세포에서 apoptosis의 유도를 측정하였다. 혈관내피세포에 방사선을 조사한 실험군에서 선량이 증가함에 따라, 그리고 시간이 경과함에 따라 선량과 시간 의존적인 양상의 apoptosis가 유도되었다 (Fig. 1.).

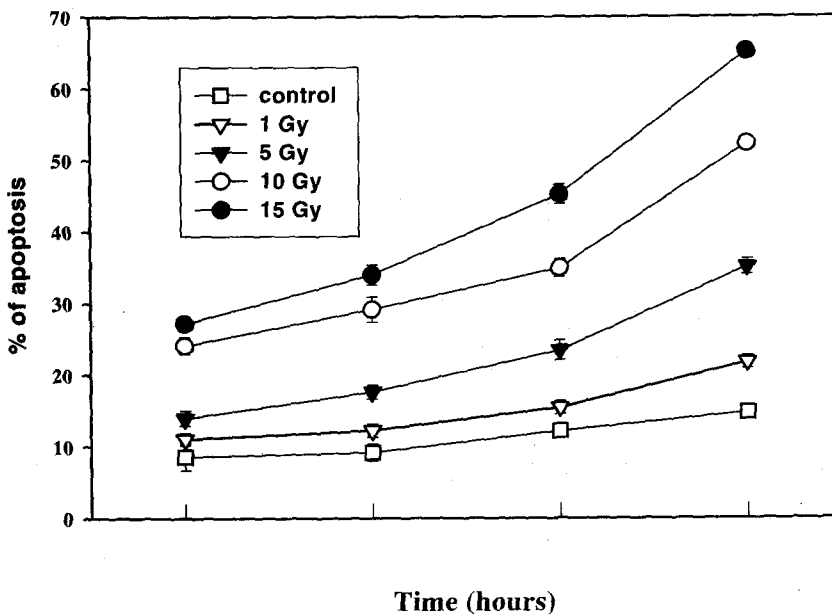


Fig. 1. radiation induce apoptosis in human umbilical endothelial cells(HUVECs). Radiation-induced apoptosis increase dose(1, 5, 10, 15Gy)-andtime(12,24,48,72)-dependent manner. The points and bars show the mean \pm S.Dd of five independent experiments.

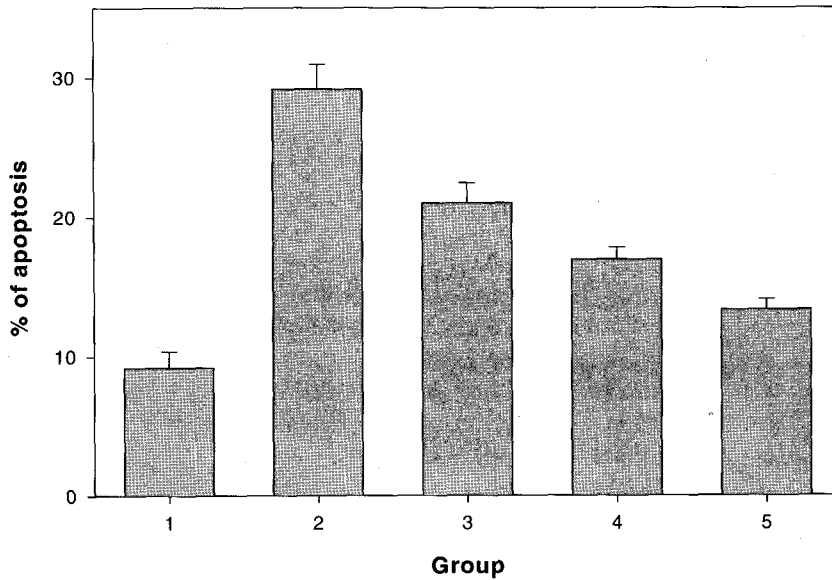


Fig. 2. basic fibroblast growth factor(bFGF) inhibits radiation-induced apoptosis in HUVECs. The points and bars show the mean \pm S.Dd of five independent experiments. Statistical analysis between the value of 10Gy irradiation and bFGF were performed using the Student t-test(** $p < 0.01$)

특히, 24시간 후에 apoptosis는 대조군(0Gy)에서 9.1%가 유도되었고, 방사선률 1, 5, 10, 15 Gy 조사한 실험군에서는 각각 12.3%, 17.5%, 29.2%, 33.9%의 apoptosis가 유도되었다. 이와 같은 결과는 다른 연구자들이 여러 가지 혈관내피세포를 이용한 실험에서 보고한 것과 유사한 것이다(9).

Fuks 등은(13)(1994) 소의 혈관내피세포에 여러 가지 선량의 방사선을 조사하고 0.75 ng/ml의 bFGF를 방사선 조사 직전과 조사 후에 처리하여 8시간 동안 더 배양한 상태에서, 방사선에 의한 apoptosis가 bFGF에 의해 현저하게 억제되었음을 보고하였다. 방사선에 의한 HUVECs의 apoptosis에 미치는 bFGF의 효과를 측정 한 본 연구에서는 HUVECs에 10Gy의 방사선을 조사하기 직전과 직후에 다양한 농도의 bFGF(1, 5, 10 ng/ml)를 처리하고 24시간이 경과한 후에 apoptosis의 변화를 측정하였는데, 그 결과

bFGF의 투여량이 증가함에 따라서 apoptosis가 억제되었다(Fig. 2.).

특히, 10 ng/ml의 bFGF 처리에 의해 10Gy를 조사한 혈관내피세포에서 50-60%의 apoptosis가 억제되었다. Fuks 등의 결과와 본 실험의 결과가 apoptosis가 유도되는 방사선 조사 후 배양 시간, apoptosis를 억제하는 bFGF의 농도- 약간 다른 것은 각 실험에 이용된 세포의 차이에 의해 나타난 결과일 것으로 추측된다.

또한, Haimovitz-Friedman 등은(16) bFGF에 의한 anti-apoptosis 효과가 protein kinase C에 의해 조절됨을 보고 하였는데, 과연 HUVECs에서도 bFGF에 의한 anti-apoptosis가 protein kinase C에 의해 조절되는지, 아니면 다른 신호전달 과정을 경유하는지의 여부를 확인하기 위해서는 별도의 실험이 더 진행되어야 할 것이다.

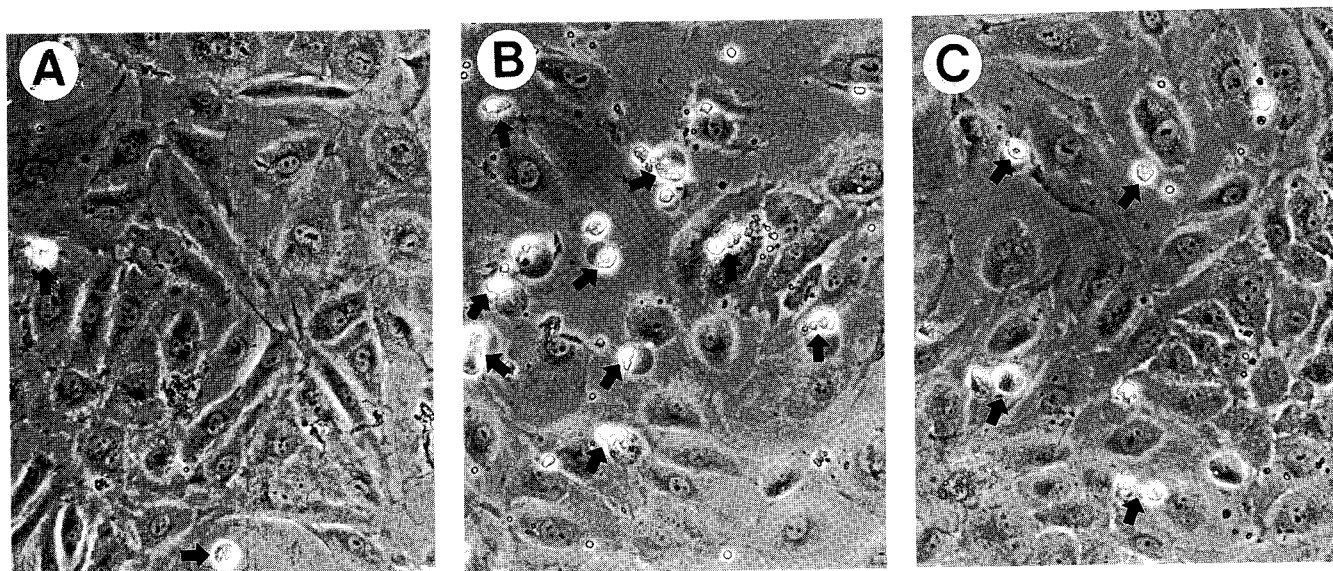


Fig. 3. Microscopic analysis of radiation-induced apoptosis in HUVECs. HUVECs were untreated (A), irradiated 10Gy (B), irradiated 10Gy plus bFGF(10 ng/ml) (C) and analyzed after 24 h by phase contrast. Arrows indicate the apoptotic cells. All magnifications are $\times 400$.

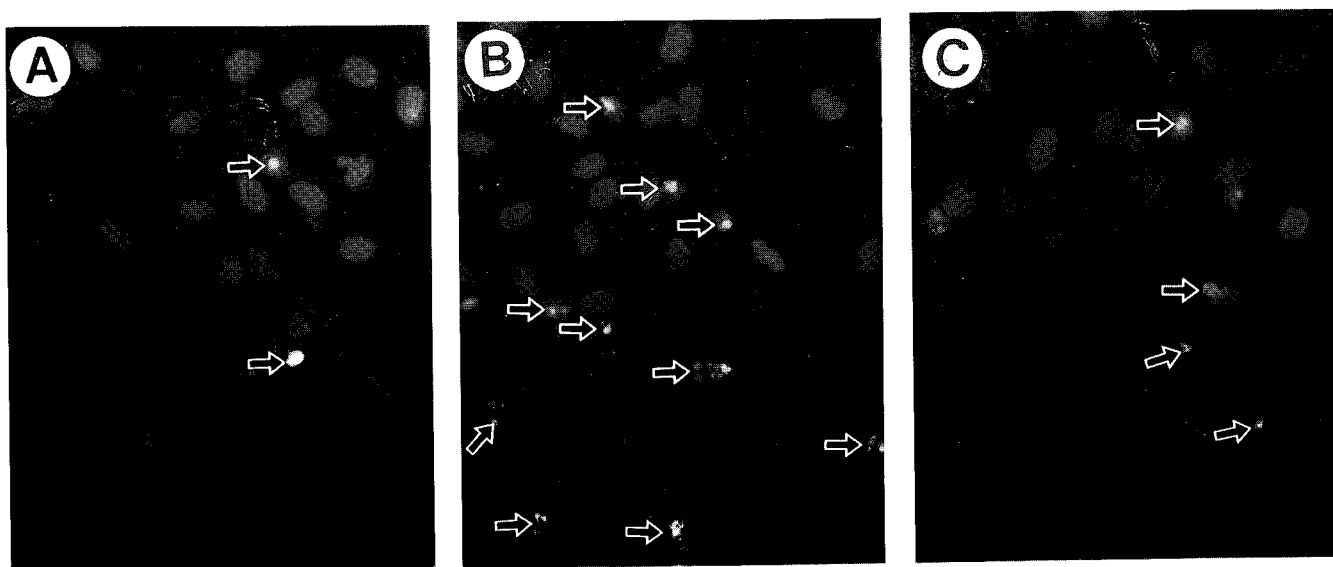


Fig. 4. Detection of apoptotic cells by morphological analysis of Sytox Green nucleic acid-stained nuclei. HUVECs were untreated (A), irradiated 10Gy (B), irradiated 10Gy plus bFGF(10 ng/ml) (C) and analyzed after 24 h by fluorescence microscopy. Arrows indicate the apoptotic cells. All magnifications are $\times 260$.

실험과정 중의 혈관내피세포의 형태적 변화를 보기 위하여 bFGF를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우로 나누어 각각에 10Gy의 방사선을 조사하고, 위상차 현미경(Fig. 3.)과 Sytox green 형광 염색법(Fig. 4.)을 이용하여 관찰하였다. 방사선을 조사하지 않은 경우(Fig. 3. A)에 비하여 10Gy를 조사한 경우는 부착된 세포보다 부유세포의 비율이 증가함을 보였으며, 혈관내피세포의 응축이 나타났다(Fig. 3. B). 한편, 방사선이 조사된 혈관내피세포에서는 bFGF 10 ng/ml를 처리한 경우는 처리하지 않은 경우보다 훨씬 적은 부유세포만이 관찰되었다(Fig. 3. C). 이와 같은 결과는 다른 연구자의 이전의 보고 유사한 결과이다(3, 8). Apoptosis는 세포내에서 핵의 응축과 DNA 분절이 나타나는 특징을 가지는데(17), Sytox green으로 염색한 결과 HUVECs 에서도 이와 같은 형태적인 변화를 확인할 수 있었다. 즉 10Gy의 방사선을 조사한 실험군에서 핵의 응축과 DNA 분절들이 다수 관찰되었다(Fig. 4. A, B). 방사선 조사에 의한 이러한 변화 역시 bFGF 10 ng/ml를 처리로 현저히 억제되었다(Fig. 4. C)

IV. 결 론

전리 방사선에 대한 혈관내피세포의 효과는 정상조직에 대한 반응에 있어 아주중요한 요소일 것으로 생각된다. 본 연구는 사람 제대정맥으로부터 혈관내피세포(HUVECs)를 분리 배양하여, 방사선 조사와 bFGF 효과에 대하여 실험하였다.

방사선 조사로 HUVECs에서 apoptosis가 유도되었고, 이는 방사선 선량의 증가와 시간의 경과에 따라 의존적인 경향을 나타내었다.

그러나, 방사선 조사로 혈관내피세포에서 유도된 apoptosis는 혈관내피세포의 강력한 증식인자인 basic fibroblast growth factor(bFGF)에 의해 억제되었다.

참 고 문 헌

1. Warren JB. The endothelium: an introduction to current research. New York, NY; Wiley-Liss, Inc. 1990.
2. Linder H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schreglmann M, Klauke I, Schultz-Hector S and Eissner G : Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair : Role of cytokines. *Blood*. 1997;89:1931-1938.
3. Eissner G, Kolhuber F, Grell M, Ueffing M, Scheurich P, Hieke A, Multhoff G, Bornkamm GW, Holler E : Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor- α in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood*. 1995;86:4184.
4. Nicosia RF and Ottinetti A : Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. *Lab Invest*. 1990;63:115-122.
5. Kantak SS, Diglio CA and Onoda JM : Low dose radiation-induced endothelial cell retraction. *Int J Radiat Biol*. 1993;64:319-328.
6. Rose RW, O'Hara MD, Williamson SK and Grant DS : The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation. *Radit Res*. 1999;152:14-28.
7. Yarnold J : Molecular aspect of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997; 44:1-7.
8. Siles E, Villalobos M, Jones L, Guerrero R, Eady JJ, Valenzuela MT, Nunez MI, McMillan TJ and Ruiz de Almodovar JM : Apoptosis after gamma irradiation. Is important cell death modality? *Br J Cancer*. 1998;78:1594-1599.

9. Langley RE, Bump EA, Quartuccio SG, Medeiros D and Braunhut SJ : Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. *BR J Cancer*. 1997;75:666-672.
10. Linder H, Holler E, Gerbitz A, Johnson JP, Bornkamm GW and Eissner G : Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo. *Transplantation*. 1997;64:1370-1373.
11. Gerber H, Dixit V, Ferrara N : Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273 :13313-13316.
12. Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y : Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* 1997;30:1198-1203.
13. Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, McLouglin M, Ehleiter D, Schwartz JL, Seddon AP, Cordon-Cardo C and Haimovitz-Friedman A : Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in Vitro and in Vivo. *Cancer Res*. 1994;54:2582-2590.
14. Kwak HJ, So J-N, Lee SJ, Kim IJ, Koh GY : Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett*. 1999;448:249-253.
15. Jaffe EA, Nachman NL, Becker CG, Minick CR : Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745
16. Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLouglin M, Ehleiter D, Michaeli J, Vlodaysky I and Fuks Z : Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1994;54:2591-2597.
17. Gaugler M-H, Squiban C, Claraz M, Schweitzer K, Weksler B, Gourmelon P and Van der Meer A : Characterization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation. *BR J Haematol*. 1998;103:980-989.