

방사선 조사에 의한 세포사에 있어서 세포고사의 의미

서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 암연구소, 의학연구원 방사선의학연구소

우 흥 균 · 김 일 한

목 적 : 사람의 두경부종양 세포주를 대상으로 방사선 조사 후에 일어나는 아포토시스를 측정하여 전체 세포사에서 의 중요성 및 방사선감수성과의 관련성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 방사선치료의 주 치료방법인 두경부종양 세포주(PCI-1, PCI-13, SNU-1066)와 정상세포 중 섬유모세포 세포주(LM217), 혈액종양 세포주 중 백혈병 세포주(CCRF-CEM)를 대상으로 하였다. 방사선 조사는 동물실험용 Cs-137 방사선조사기를 사용하였다. 전체 세포사는 집락형성능측정을 이용하였고, 아포토시스의 측정은 annexin-V와 propidium iodide를 이용하는 염색법을 사용하였다.

결 과 : 2 Gy 방사선 조사 시의 생존분획인 SF₂는 PCI-1, PCI-13, SNU-1066, CCRF-CEM, LM217 세포주에서 각각 0.741, 0.544, 0.313, 0.302, 0.100으로, LM217 세포주가 방사선감수성이 가장 높았고 PCI-1 세포주의 방사선감수성이 가장 낮았다. 두경부암 세포주인 PCI-1, PCI-13, SNU-1066에서는 모두 72시간이 경과한 후 아포토시스지수가 최대치에 도달하였으며, LM217과 CCRF-CEM에서는 24시간 후에 최대치에 도달하였다. 방사선량의 증가에 따라서 전체세포사는 현저하게 증가하였으나 아포토시스지수의 변화는 매우 작았다. 전체 세포사에 대한 아포토시스의 분획(아포토시스분획)은 2 Gy 조사 시 PCI-1, PCI-13, SNU-1066, CCRF-CEM, LM217에서 각각 46%, 48%, 46%, 24%, 19%이었고, 6 Gy 조사 시 각각 20%, 33%, 35%, 17%, 20%이었다. 아포토시스의 정도와 6 Gy 조사 시의 방사선 감수성과는 일정한 관계를 보이지 않았으나, 2 Gy 조사 시 방사선에 감수성이 비교적 높은 세포주가 아포토시스분획이 작았다.

결 론 : 본 연구에서 사용한 두경부암세포주에서 방사선 조사 후 아포토시스가 관찰되었으며, 발생 양상이 시간적으로 정상 섬유모세포 및 백혈병세포주와 다른 것을 확인하였다. 또한 아포토시스보다는 다른 종류의 세포사인 증식사가 더 중요하게 작용하고 있음을 알 수 있었다. 아포토시스분획과 2 Gy 조사 시 방사선감수성 사이에 관련 가능성이 제시되었다.

핵심용어 : 방사선, 아포토시스, 증식사

서 론

전통적으로 암 치료는 암세포의 빠른 증식을 억제하는 방향으로 집중되어 왔다. 그러나 암이라는 질병의 특징으로서 빠른 증식뿐 아니라 비교적 세포고사가 적게 일어난다는 점이 강조되면서 항암치료의 세포고사 유발 기능이 중요한 연구 대상이 되고 있다.¹⁻³⁾ 세포고사 또는 세포예정사는 유전학적으로 질서정연하게 조절되는 세포사의 한 형태로서 Kerr 등이 처음 기술하였다.⁴⁾ 이것은 다세포 생물에서 필요하지 않거나 아치사손상을 받은 세포를 제거하는 정상적인 생리

적 세포사를 의미한다.

일반적으로 세포사의 과정은 괴사 또는 세포고사로 나타난다.⁴⁾ 그리고 방사선에 의한 세포사는 방사선 조사 후 세포사가 일어나는 시간에 따라서 중간기사(interphase death)와 증식사(reproductive death or mitotic death)로 분류된다.⁵⁾

중간기사는 세포고사의 한 예로 생각되고 있으며, 방사선에 민감한 흉선세포,⁶⁾ T-세포 백혈병 세포,⁷⁾ 소장 소낭선 세포,⁸⁾ 신생아 신장 세포,⁹⁾ 타액선과 누선의 장액성 포상세포(serous acinar cell)¹⁰⁾ 및 쥐의 종양세포의 일부에서¹¹⁾ 비교적 저선량인 0.2~2.5 Gy의 방사선조사 후 6~24시간 내에 발생하는 빠른 세포사가 보고된 바 있다. 이러한 방사선에 의한 세포사는 세포가 다음 세포 주기로 진행하거나 분열하지 않는 세포에서 일어나기 때문에 중간기사라고 하며, 미세용모의 소실, 매끈매끈한 표면 또는 물집이 생긴 표면, 세포막 투과성의 변화, 세포 용적의 감소, 세포질과 염색사의 응축, DNA의 뉴클레오솜간 분열과 같은 형태학적인 특징을 갖는다.⁷⁾

중간기사와 달리 증식사는 방사선 조사 후 수회의 세포

이 연구는 서울대학교 발전기금 및 간접연구경비에서 지원된 연구비에 의해 수행되었음

이 논문은 2001년 4월 6일 접수하여 2001년 6월 29일 채택되었음.

책임 저자: 우흥균, 서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실

Tel: 02)760-3177, Fax: 02)765-3317

E-mail: wuhg@snu.ac.kr

분열을 거친 후에 일어난다.⁹⁾ 증식사는 방사선에 의한 DNA 및 염색체 손상에 의해서 일어나는 것으로 생각되고 있다.¹²⁾ 그러나 증식사에 대하여 그 밖에 밝혀진 것은 많지 않다.

Radford 등은 림프계 세포주 및 골수계 세포주에서 방사선 조사 후에 시간이 경과하면서 세포고사에 의한 세포사가 계속 발생함을 보고한 바 있다.^{13, 14)} 또한 한두번의 세포 분열 후 유사분열세포사 과정에 의해 서서히 죽어 가는 세포에서도 세포고사가 발생함을 보고하였다.¹⁴⁾ 방사선조사 후 증식사 과정 중의 쥐의 T-세포 기원의 세포주에서도 세포고사가 발생함이 보고되었다.¹⁵⁾ 마찬가지로 흉선세포와 같이 방사선 감수성이 높은 세포에서의 세포고사는 중간기사가 대부분이면서 증식사에도 관계가 있다고 보고되었다.³⁾

임상에서 사용하는 항암치료 효과의 평가는 세포 증식의 억제능력을 기준으로 한다는 전제하에 대개 세포집락형성능 측정¹⁶⁾ 또는 tetrazolium을 이용한 비색분석법(MIT assay)을 이용해 왔다.¹⁷⁾ 세포고사 및 괴사 유발 능력을 기준으로 효과를 평가하고, 세포고사 및 괴사 유발 능력과 세포사의 관계를 정량적으로 계량하기 위한 유세포분석 모델도 제시된 바 있다.¹⁸⁾

암의 치료에서 중요한 역할을 차지하는 방사선치료의 효과 역시 항암제와 마찬가지로 세포 증식의 억제능력을 기준으로 평가한다. 본 연구에서는 방사선치료의 주 대상이 되는 인체 두경부암 세포주를 대상으로 방사선 조사 후 세포고사의 발생 양상을 관찰하고 전체 세포사와의 정량적 관계 및 방사선감수성과의 관련성을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구에 사용된 세포주 및 배양

종양 세포주는 두경부종양 기원의 PCI-1 (재발성 성문암 기원)과 PCI-13 (후구치삼각부암 기원)을 서울대학교 의과대학 이비인후과학교실에서 분양 받았고, SNU-1066 (성문암 기원)은 대한세포주은행에서 구입해서 사용하였다. 고히암세포인 두경부암세포와의 비교를 위해서 혈액종양 세포주로 CCRF-CEM (급성 림프구성 백혈병 기원)을 대한세포주은행에서 구입해서 사용하였다. 또한 정상 세포로서 섬유모세포 세포주인 LM217은 울산대학교 의과대학에서 분양 받아 사용하였다.

PCI-1, PCI-13, LM217 세포주는 DMEM 배지에서, SNU-1066과 CCRF-CEM은 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 모든 배지는 열로 비활성화시킨 10% fetal bovine serum (FBS)과 gentamycin 100 µg을 첨가한 후, 37°C, 5% CO₂의 조건에서

배양하였으며, 세포수 및 배양상태에 따라 2~3일마다 분주하거나 신선한 배지로 교환하였다.

2. 방사선조사

서울대학교 암연구소에 설치되어 있는 동물실험용 Cs-137 방사선조사기(Mark type I, Shepherd, USA)를 사용해서 방사선을 조사하였다. 방사선조사의 선량률은 중심에서 3 Gy/분이었고, 방사선량은 조사시간으로 조절하였다. 방사선을 조사하지 않은 대조군도 방사선조사기 내에서 허위조사를 시행하였다. 모든 실험은 세포의 수를 계측하고 플라스크에 옮기고 24시간 후에 방사선을 조사하였다.

3. 집락형성능측정(colony formation assay, clonogenic assay)

방사선에 의한 세포사 전체를 파악하기 위해서 세포 집락형성능을 측정하였다. 지수기의 성장 세포를 취해서 방사선 조사 후 14일 동안 배양한 후 배지를 흡입하고 100% methanol 5 µL으로 10분간 고정시킨 후 crystal violet 2 µL으로 10분간 염색한 후 점적수로 여분의 혼합액을 제거하였다. 실온에서 1시간 건조시킨 후 세포집락을 육안적으로 관찰하여 50개 이상의 세포로 구성된 세포집락의 수를 계측하였다. 대조군에서 얻은 배양효율(plating efficiency, P.E.)을 기준으로 실험군의 생존분획(surviving fraction, S.F.)을 보정하였다.

$$P.E. = \frac{\text{형성된 세포 집락의 수}}{\text{배양시킨 대조군 세포수}} \times 100 (\%)$$

$$S.F. = \frac{\text{형성된 세포 집락의 수}}{\text{배양시킨 실험군 세포의 수} \times (P.E./100)}$$

각 세포주마다 방사선 조사선량에 따라서 세포수가 다른 두가지 조건에서 3회씩 생존분획을 측정하여 평균값을 구하였다.

4. 세포고사의 계측

세포고사의 계측은 유세포분석으로 세포고사를 계측하는 방법인 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma A2214, USA)를 사용하였다.¹⁹⁾ Annexins는 칼슘의 존재 하에서 인지질과 결합을 하는 단백질이며, annexin V-FITC는 칼슘의 존재 하에서 포스파티딜세린과 결합하는 형광표지물이다. 살아 있는 세포에서는 능동적 수송에 의해서 포스파티딜세린이 세포내에 위치하는데 세포고사가 진행하면서 세포막의 바깥쪽에 위치하게 된다. Annexin V-FITC가 칼슘의 존재 하에 이 포스파티딜세린과 결합하는 성질을 이용하였다.

세포주에 2, 4, 6, 15 Gy의 방사선조사 후 24, 48, 72, 96 시간 경과한 후 인산원충식염수(PBS)로 2회 세척하였다. 1,200 rpm으로 5분간 원심분리 후 약 1×10^6 개/mL의 세포를 취해서 $1 \times$ binding buffer 500 μ L와 섞어 12 \times 75 mm 시험관에 넣었다. 암실에서 여기에 annexin V-FITC 5 μ L와 propidium iodide 10 μ L를 첨가하였다. 빛을 차단한 상온에서 10 분간 작용시킨 후 즉시 유세포분석기를 이용해서 형광을 측정하였다. 세포고사에 있는 세포는 annexin V-FITC에만 염색되고, 살아 있는 세포는 어느 것에도 염색되지 않고, 괴사된 세포는 propidium iodide와 annexin V-FITC 모두에 염색된다.

세포고사를 3회씩 측정하여 결과를 세포고사지수(apoptotic index, AI)와 세포고사분획(apoptotic fraction, AF)의 두가지 방법으로 표시하였다. 세포고사지수는 전체세포사를 고려하지 않은 세포고사 측정 당시 생존한 전체 세포에 대한 세포고사로 측정된 세포 분획이며, 세포고사분획은 집락형성능 측정 및 비색분석법으로 측정된 전체세포사에 대한 세포고사의 분획으로 각각 정의하였다.

$$A.I. = \frac{\text{세포고사를 보이는 세포 수}}{\text{측정한 전체 세포 수}}$$

$$A.F. = \frac{A.I.}{(1 - \text{세포집락형성능으로 측정된 생존분획})} \times 100 (\%)$$

5. 자료의 처리

세포주 사이의 결과의 차이는 SPSS 통계프로그램(Release 9.01, SPSS Inc., 1999)을 이용해서 Mann-Whitney 법으로 분석하였고, 집락형성능 측정과 비색분석법의 상관성 및 세포고사사와 전체세포사의 관계는 Spearman's correlation 방법으로 분석하였다.

결 과

1. 방사선조사 후의 세포사

2 Gy 방사선조사 시 생존분획은 PCI-1, PCI-13, SNU-1066,

CCRF-CEM, LM217이 각각 0.741, 0.544, 0.313, 0.302, 0.100 이었고, 6 Gy 조사 시에는 각각 0.140, 0.039, 0.019, 0.060, 0.001로 LM217이 방사선에 가장 민감하였고 PCI-1이 가장 저항성을 보였다(Table 1).

2. 방사선조사 후의 세포고사

방사선을 조사하지 않은 대조군에 비해서 두경부암세포주에서는 방사선조사 후 48~72시간이 경과한 후부터 세포고사가 증가하였다(Table 2~6). PCI-1 세포주와 PCI-13 세포주는 48시간까지 큰 변화가 없다가 72시간부터 세포고사가 증가하였고, SNU-1066 세포주는 48시간부터 세포고사가 증가하였다. 세포고사의 증가 양상은 2 Gy와 6 Gy 조사에 따른 차이를 관찰할 수 없었다. PCI-13 세포주에서 15 Gy를 조사했을 때 2 Gy나 6 Gy에 비해서 세포고사가 현저히 증가하였다.

CCRF-CEM 세포주는 방사선조사 24시간 후부터 세포고사가 증가하였다. 정상 섬유모세포주인 LM217 세포주는 방사선을 조사하지 않은 경우에도 시간이 경과하면서 세포고사

Table 2. Apoptotic Index according to Radiation Dose and Time after γ -Irradiation for LM217 Cells

Dose* (Gy)	Time after irradiation (hr)			
	24	48	72	96
0	3.58%	7.70%	10.30%	21.32%
2	16.90%	10.46%	10.42%	16.58%
4	8.60%	19.54%	16.74%	12.72%

*6 Gy was omitted because of high radiation-sensitivity of LM217

Table 3. Apoptotic Index according to Radiation Dose and Time after γ -Irradiation for PCI-1 Cells

Dose (Gy)	Time after irradiation (hr)			
	24	48	72	96
0	4.66%	7.86%	3.72%	7.04%
2	5.42%	7.30%	11.40%	11.84%
4	6.06%	7.44%	20.24%	20.16%
6	7.04%	11.84%	16.82%	16.36%

Table 4. Apoptotic Index according to Radiation Dose and Time after γ -Irradiation for PCI-13 Cells

Dose (Gy)	Time after irradiation (hr)			
	24	48	72	96
0	19.55%	11.83%	12.83%	13.90%
2	12.32%	9.61%	21.82%	21.82%
6	9.40%	7.08%	31.48%	24.26%

Table 1. Surviving Fraction at 2 Gy (SF₂) and 6 Gy (SF₆) of γ -Irradiation

Cell line	SF ₂	SF ₆
LM217	0.100	0.001
PCI-1	0.741	0.140
PCI-13	0.544	0.039
SNU-1066	0.313	0.019
CCRF-CEM	0.302	0.060

Table 5. Apoptotic Index according to Radiation Dose and Time after γ -Irradiation for SNU-1066 Cells

Dose (Gy)	Time after irradiation (hr)			
	24	48	72	96
0	8.78%	13.54%	13.42%	15.40%
2	6.40%	20.60%	20.26%	31.38%
4	5.82%	19.78%	28.60%	33.76%
6	4.34%	21.66%	30.44%	35.14%

Table 6. Apoptotic Index according to Radiation Dose and Time after γ -Irradiation for CCRF-CEM Cells

Dose (Gy)	Time after irradiation (hr)			
	24	48	72	96
0	3.38%	3.46%	2.42%	2.18%
2	10.08%	16.64%	8.98%	9.62%
4	9.20%	16.12%	14.98%	15.36%
6	12.10%	15.68%	11.76%	8.14%

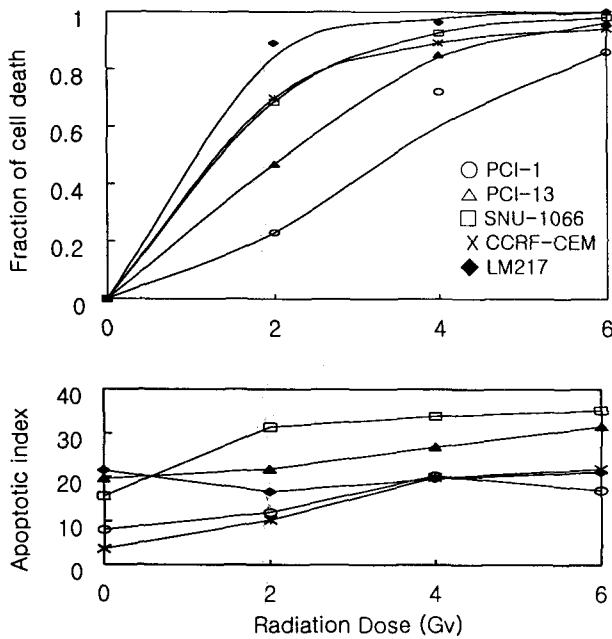


Fig. 1. Total cell death, which is measured with clonogenic assay, rapidly increased with dose increment (upper panel). But the change in amount of apoptosis was little (lower panel).

가 증가하였고, 2 Gy 조사 시에는 세포고사의 변화가 거의 없었고, 4 Gy 조사 시 24시간 부터 세포고사가 증가하여 72 시간부터는 다시 감소하였다.

방사선량의 증가에 따라서 전체세포사는 현저하게 증가하였으나 세포고사지수의 변화는 매우 작았다(Fig. 1).

Table 7. Comparison of Surviving Fraction with Apoptotic Index and Apoptotic Fraction after Irradiation of 2 Gy.

Cell line	SF ₂ *	Total death	Apoptotic index (A.I.)	Apoptotic fraction† (A.F.)
LM217	0.100	0.90	17%	19%
PCI-1	0.741	0.26	12%	46%
PCI-13	0.544	0.46	22%	48%
SNU-1066	0.313	0.69	32%	46%
CCRF-CEM	0.302	0.70	17%	24%

*SF₂: surviving fraction at 2 Gy

†A.F.=(A.I./total death) × 100

Table 8. Comparison of Surviving Fraction with Apoptotic Index and Apoptotic Fraction after Irradiation of 6 Gy

Cell line	SF ₆ *	Total death	Apoptotic index (A.I.)	Apoptotic fraction† (A.F.)
LM217	0.001	0.999	20%	20%
PCI-1	0.140	0.860	17%	20%
PCI-13	0.039	0.961	32%	33%
SNU-1066	0.019	0.981	34%	35%
CCRF-CEM	0.060	0.940	16%	17%

*SF₆: surviving fraction at 6 Gy

†A.F. = (A.I./total death) × 100

3. 전체 세포사와 세포고사

전체 세포사에 대한 세포고사의 분획과 전체 세포사(SF2 및 SF6)의 관계를 Table 7, 8에 표시하였다. 2 Gy 및 6 Gy에서 모두 생존분획과 세포고사지수는 관련성이 없었다(R²=0.0934, 0.2425). 생존분획과 전체 세포사에서 세포고사가 차지하는 비율은 2 Gy 조사 시 상관성이 컸으나 6 Gy 조사 시에는 뚜렷한 관계가 관찰되지 않았다(R²=0.5873, 0.1438).

고 안

일반적으로 알려져 있는 방사선에 의한 세포사의 두가지 방법은 중간기사와 증식사로 나뉘어진다.¹³⁾ 중간기사는 방사선 조사 후 첫 유사분열이 시작하기 전에 죽는 세포사로 정의된다. 이것은 형태학적으로 핵이 응축되고 수축하면서 염색체의 뉴클레오솜간 파괴가 일어나는데, 전형적인 세포고사의 한 예라고 할 수 있다. 반대로 증식사의 특징은 주로 세포포집력 형성 능력으로 측정하는 증식능력(clonogenicity)의 소실이다. 전형적인 증식사란 세포가 대사활동은 지속하지만 세포분열능력을 상실하는 것을 의미한다.²⁰⁾ 그러나 세포분열 후에도 세포가 죽을 수 있을 것이다. 최근 Halicka 등은 세포의 DNA 양과 *in situ* 쇠절단(strand break)의 측정을 통해서

γ 선 조사 후 G2/M 기의 세포들에서 주로 세포고사가 일어나는 것을 보고하였다.²¹⁾ 이 결과에서 γ 선 조사 후에 일어나는 세포고사의 대부분은 방사선량에 비례해서 G2 정지 후에 발생한다고 볼 수 있다. 그러나 G2 정지와 세포고사를 조절하는 유전자는 서로 다르며,²²⁾ G2 정지 후에 일어나는 세포고사는 세포고사 유발에 중요한 단백질인 p53과 관계가 없다.²³⁾

방사선조사 후 조기에 일어나거나 세포분열 전에 일어나는 세포고사는 세포에 방사선을 조사한 후 대개 3~8시간에 일어난다. 방사선과 관련된 세포고사가 처음 발견된 후 보고된 대부분의 연구가 이런 조기에 일어나는 세포고사이었다.^{6~11)} 그러나 전형적인 세포고사는 상당한 시간이 지나서 일어나며, 이런 경우 세포사는 일차적 손상뿐 아니라 세포주기가 정지한 동안에 이차적 변화의 축적에 의해서도 일어날 수 있다.²¹⁾ 방사선조사를 받은 세포에서 세포고사가 일어나기 전에도 세포주기가 계속 진행된다는(지연 또는 유사분열 후 세포고사) 보고가 증가하고 있다.^{21, 24)} Shinomiya 등은 사람의 단핵구계 세포주에서 X선을 조사한 후 방사선량에 따라서 유사분열전 세포고사 또는 유사분열 후 세포고사가 일어나는 것을 보고하였다.²⁵⁾ 이와 같이 현재까지 방사선 조사 후 세포고사에 관한 대부분의 연구가 정상 림프구 또는 백혈병 및 림프종 등 혈액종양 세포주를 대상으로 이루어졌으며, 고형암 세포주를 대상으로 보고된 것은 매우 드물다. 또한 세포고사라는 측면에서 중간기사와 증식사의 차이에 관한 보고도 적다. Algan 등은 사람의 전립선암 세포주에서 방사선 조사 후 24시간 내에 발생하는 세포고사의 중요한 역할에 대해서 보고했는데, DU-145 세포주에서 집락형성능으로 측정되는 single-hit killing의 5%가 세포고사에 의한 것이라고 하였다.²⁶⁾ 본 연구에서는 정상 섬유모세포주인 LM217 세포 및 백혈병 세포주인 CCRF-CEM이 24시간에 세포고사의 증가를 보인 반면 고형암 세포주인 PCI-1, PCI-13, 및 SNU-1066에서는 모두 72시간 후에 세포고사의 증가를 보여 주로 고형암 세포에서 세포고사가 일어나는 기전에 차이가 있을 수 있음을 나타냈다.

높은 세포고사지수를 보이는 세포에 대해서 두가지 상반되는 결과를 예측할 수 있다. 첫째는 방사선치료에 대한 반응과 국소조절이 증가해서 결과적으로 원격전이를 감소시키는 것이고, 둘째는 빨리 증식하는 악성종양에서는 원격전이가 일어나기 쉽다는 것이다. Levine 등은 자궁경부암 환자의 치료전 세포고사지수, SF2, 유사분열지수를 측정하여 세포고사지수 또는 SF2가 중앙값보다 높은 환자의 생존율이 유의하게 나쁜 것을 보고하였다.²⁷⁾ 이 연구에서도 세포고사지수

와 유사분열지수 간에 유의한 관계가 있었다. 그러나 유사분열지수는 유의한 예후인자가 아니었다. 따라서 세포고사지수가 악성종양의 증식 정도를 나타낼 수는 있으나 이것만으로 치료결과와의 상관성을 설명하기는 어렵다고 하였다. 오 등은 폐 편평세포암을 대상으로 한 연구에서 III 병기인 경우 세포고사지수가 높을수록 짧은 생존기간을 보였으나, 세포고사지수가 낮은 경우 원격전이의 가능성이 높다고 보고하였다.²⁸⁾ Wheeler 등은 Levine 등의 보고와 반대로 자궁경부암에서 세포고사지수가 높을수록 반응률이 높다고 보고하였다.²⁹⁾ 결국 이런 결과들은 암조직의 세포고사와 내재적 방사선 감수성 사이에 복잡한 관계가 있음을 시사한다. 현재 세포고사와 유사분열세포사의 상대적 중요성에 관한 정설은 없으며 아마 세포의 종류와 병기에 따라서 차이가 있을 것으로 생각되고 있다.

본 연구에서는 세포고사 지수 및 전체 세포사에서 세포고사가 차지하는 분획과 방사선 감수성과의 관계를 비교하였는데, 전체 세포사에서 세포고사의 분획이 높을수록 방사선에 저항이 있는 것으로 나타난 반면, 세포고사지수와 방사선 감수성과는 뚜렷한 관계를 관찰할 수 없었다. 이 결과에서 현재까지 대부분의 연구에서 언급한 세포고사지수만으로 방사선 감수성 및 방사선 반응을 예측하기 어려우며, 세포고사를 방사선 감수성에 대한 지표로 사용하려면 전체세포사와 함께 고려해야한다는 것을 알 수 있다. 본 연구와 같은 전체 세포사에서 세포고사의 상대적 중요성에 대한 연구보고는 드물고, 특히 두경부암 세포주만을 대상으로 한 연구는 문헌상 찾을 수가 없다. 향후 이 결과의 의미와 임상적 중요성을 파악하기 위해서 다른 세포주 및 조직을 이용한 연구가 더 필요하다.

결 론

세포고사의 최대발현시기는 방사선감수성이 낮은 두경부암세포주에서는 지연되어 관찰되고, 방사선감수성이 높은 급성 림프구성 백혈병 세포주 및 정상 섬유모세포주에서는 조기에 관찰되어 발생기전이 서로 다를 가능성이 있다.

모든 세포주에서 방사선량과 전체 세포사는 비례하였으나, 세포고사지수는 방사선량이 증가해도 전체 세포사의 증가에 비해서 큰 변화가 없었다. 따라서 본 연구에서 사용한 세포주에서는 세포고사와 다른 종류의 세포사인 증식사가 더 중요하게 작용하고 있음을 알 수 있었다.

세포고사분획과 방사선 감수성과의 관계는 통상 분할 선량인 2 Gy에서만 관찰되어, 세포고사분획이 적을수록 방사선

에 대한 감수성이 증가하였다.

참 고 문 헌

1. Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Sci* 1997;19:119-125
2. Kruman II, Matylevich NP, Beletsky IP, Afansasyev VN, Umansky SR. Apoptosis of murine BW5147 thymoma cells induced by dexamethasone and gamma-irradiation. *J Cell Physiol* 1991;148:267-273
3. Tauchi H, Sawada S. Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukemia L5178Y cells: apoptosis is the ultimate form of cell death following mitotic failure. *Int J Radiat Biol* 1994;65:449-455
4. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257
5. Okada S. Radiation-induced death. In: Altman KI, Gerber GB, Okada S. *Radiation Biochemistry*, Vol. 1. Cells. New York, Academic. 1970; 247-307
6. Ohyama H, Yamada T, Inoue Y. Effect of post-irradiation temperature on viability of rat thymocytes. *Int J Radiat Biol* 1974;26:535-546
7. Haris AW, Lowenthal JW. Cells of some cultured lymphoma lines are killed rapidly by X-rays and bleomycin. *Int J Radiat Biol* 1982;42:111-116
8. Potten CS. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and γ -irradiation. *Nature* 1977;269:518-520
9. Gobe GC, Axelsen RA, Harmon BV, Allan DJ. Cell death by apoptosis following X-irradiation of the fetal and neonatal rat kidney. *Int J Radiat Biol* 1988;54:567-576
10. Stephens LC, Schultheiss TE, Price RE, Ang KK, Peters LJ. Radiation apoptosis of serous acinar cells of salivary and lacrimal glands. *Cancer* 1991a;67:1539-1543
11. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, Milas L, Meyn RE. Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiat Res* 1991b;127:308-316
12. Joshi GP, Nelson WJ, Revell SH, Shaw CA. X-ray-induced chromosome damage in live mammalian cells, and improved measurement of its effects on their colony-forming ability. *Int J Radiat Biol* 1982;41:161-181
13. Radford IR. Mouse lymphoma cells that undergo interphase death show markedly increased sensitivity to radiation-induced DNA double-strand breakage as compared with cells that undergo mitotic death. *Int J Radiat Biol* 1991;59:1353-1369
14. Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int J Radiat Biol* 1994;65:217-227
15. Warters RL. Radiation-induced apoptosis in a murine T-cell hybridoma. *Cancer Res* 1992;52:883-890
16. Puck TT. A rapid method of viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cell to supply conditioning factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;41:432-441
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63
18. Guchelaar HJ, Vermes I, Koopmans RP, Reutelingsperger CPM, Haanen C. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42:77-83
19. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996;24:131-139
20. Thompson LH, Suit HD. Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time-lapse photography. *Int J Radiat Biol* 1969;15:347-362
21. Halicka HD, Seiter K, Feldman EJ. Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis* 1997;2: 25-39
22. Barbet NC, Carr AM. Fission yeast wee 1 protein kinase is not required for DNA damage-dependent mitotic arrest. *Nature* 1993;364:824-827
23. Iwamoto K, Shinomiya N, Mochizuki H. Different cell cycle mechanisms between UV-induced and X-ray-induced apoptosis in WiDr colorectal carcinoma cells. *Apoptosis* 1999;4:1-8
24. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:781-796
25. Shinomiya N, Kuno Y, Yamamoto F, et al. Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in x-irradiated U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:767-777
26. Algan O, Stobbe CC, Helt AM. Radiation inactivation of human prostate cancer cells: The role of apoptosis. *Radiat Res* 1996;146:267-275
27. Levine EL, Renehan A, Gossiel R, et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 1995;37:1-9
28. Oh YK, Kee KH. Spontaneous apoptosis and metastasis in squamous cell carcinoma of the lung. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 1999;17:203-208
29. Wheeler JA, Stephen LC, Tornos C, et al. ASTRO fellowship: apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage Ib cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1487-1493

Abstract

Significance of Apoptotic Cell Death after γ -Irradiation

HG Wu, M.D., Ph.D. and IH Kim, M.D., Ph.D.

Department of Therapeutic Radiology and Cancer Research Institute,
Seoul National University College of Medicine
Institute of Radiation Medicine, Medical Research Center, Seoul National University

Purpose : The objectives of this study are to investigate the significance of apoptotic death compared to total cell death after γ -ray irradiation in human H&N cancer cell lines and to find out correlation between apoptosis and radiation sensitivity.

Materials and method : Head and neck cancer cell lines (PCI-1, PCI-13, and SNU-1066), leukemia cell line (CCRF-CEM), and fibroblast cell line (LM217) as a normal control were used for this study. Cells were irradiated using Cs-137 animal experiment irradiator. Total cell death was measured by clonogenic assay. Annexin-V staining was used to detect the fraction of apoptotic death.

Results : Surviving fraction at 2 Gy (SF2) were 0.741, 0.544, 0.313, 0.302, and 0.100 for PCI-1, PCI-13, SNU-1066, CCRF-CEM, and LM217 cell lines, respectively. Apoptosis was detected in all cell lines. Apoptotic index reached peak value at 72 hours after irradiation in head and neck cancer cell lines, and that was at 24 hours in CCRF-CEM and LM217. Total cell death increased exponentially with increasing radiation dose from 0 Gy to 8 Gy, but the change was minimal in apoptotic index. Apoptotic fractions at 2 Gy were 46%, 48%, 46%, 24%, and 19% and at 6 Gy were 20%, 33%, 35%, 17%, and 20% for PCI-1, PCI-13, SNU-1066, CCRF-CEM, and LM217, respectively. The radioresistant cell lines showed more higher apoptotic fraction at 2 Gy, but there was not such correlation at 6 Gy.

Conclusion : All cell lines used in this study showed apoptosis after irradiation, but time course of apoptosis was different from that of leukemia cell line and normal fibroblast cell line. Reproductive cell death was more important mode of cell death than apoptotic death in all cell lines used in this study. But there was correlation between apoptotic fraction and radiation sensitivity at 2 Gy.

Key Words : Radiation, Apoptosis, Mitotic death