- 원 저 -

ISSN 1226-2854

연골세포 분화에 미치는 X-선의 영향

— The Effects of X-Irradiation on the chondrogensis of mesenchymal cells —

경북대학교병원 진단방사선과

하 종 렬

— 국문요약 —

이미 분화된 연골세포의 성숙과정에 미치는 X-선의 작용에 대해서는 잘 알려져 있다. 그러나 연골세포나 섬유아세포, 근육세포로 분화될 수 있는 미분화 간충직 세포의 분화과정에 미치는 X-선의 영향에 대해서는 잘 알려져 있지 않아, 본 연구에서는 초기 분화연구에 좋은 대상이 되는 계배 미분화 간충직세포를 이용하여 선량(1-10Gy)에 따라 연골세포 분화 과정에 X-선이 어떤 영향을 미치는가를 조사하였다.

연구결과 선량 의존적으로 연골세포분화가 억제됨을 alcian blue로 sulfated proteoglycan을 염색한 결과를 통해 알 수 있었다. 이는 X-선이 간충직세포와 같은 성숙 이전의 연골성 세포들에게는 모두 영향을 미침을 보여주는 것이다. 또한 이미 알려진 바와 같이 X-선은 분화된 연골세포의 성숙과정에 영향을 주기도 하지만 상기 연구를 통해서 간충직세포로부터 연골세포로 분화하는 과정을 억제시키기도 함을 보여줌으로써 간충직세포로부터 성숙된 연골세포로 되는 전과정에 X-선이 영향을 미친다는 사실과, 분화가 이루어지지 않은 세포일수록 X-선 조사의 영향을 크게 받음을 알 수 있다.

Ⅰ. 서 론

세포분화는 수정란으로부터 유래된 미분화 세포가 특정 형질을 갖는 세포들로 변화되어 가는 과정이며, 연골분화는 척추동물 배의 발생 과정에서 뚜렷하게 나타나는 세포분화 현상의 하나로, 여러 종에서 많이 연구되고 있으며, 특히 구하기 쉽고 발생과정의 배의 상태가 체계적으로 잘 정리되어 있는 발생 계배 limb bud에 있는 간충직 세포의 연골분화에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Solursh, 1990 ; Daniels and Solursh 1991).

이와 같은 연골의 분화에는 많은 단백질들이 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 단백질들은 성장인자, 신호분자, 그리고 효과분자들로 나눌 수 있다. 성장인자들은 세포표면의 수용체에 결합하여 일련의 반응을 시작하는 분비 단백질들로 fibroblast growth factor(FGF), WNT 단백질, Hedgehog 단백질 등이 있다. 신호 분자들은 성장인자의 결합에 대하여 세포반응을 이어주는 세포내 단백질들이다. 마지막으로 효과 단백질들은 성장인자 신호의 아래 부분에 있는 결과 단백질들로 세포외 기질 단백질을 들 수 있는데 대표적인 것이 proteoglycan과 type Ⅱ collagen이다.

X-선은 여러 종류의 조직이나 세포에 조사되었을 경우, 그 효과는 물리적 단계, 화학적 단계, 생물학적 단계의 작용기전으로 구분되어(Suthereland, 1978 ; Mettler and Upton, 1995 ; Bushong, 1984 ; Fritz-Niggli, 1995) 다양한 작용을 하며, 직접 DNA에 작용하거나, free radical을 형성하여 간접적으로 DNA에 손상을 주어 세포주기의 정체, DNA 손상의 복구, 유전자 돌연변이, 악성종양의 형질 변환과 세포사 등의 생물학적 변화를 일으키게 된다(Hall *et al.*, 1988 ; Limoli *et al.*, 1993 ; Allen, 1992). 또한 최근에는 X-선이 DNA의 직접손상에만 국한되어 있는 것이 아니라 세포막을 통한 신호전달도 유도한다는

보고가 있다(Cohen-Jonathan *et al.*, 1999). 간충직 미분화 세포가 주로 연골세포로 분화하는데, 이 과정에서 분화 이상으로 인해 연골비대증, 발육부전증, 연골이 형성, 연골암 등의 질병이 유발될 수 있으며, 성숙 연골세포에서 X-선 조사는 주로 비정상적인 골성장이나 관절증 등을 유발하는데, 이는 연골의 비정상적인 기능 때문인 것으로 추정되고(Shimanovskaya *et al.*, 1983 ; Kolar *et al.*, 1967)있다. 미성숙 관절 연골세포에서는 물분자의 이온화 과정을 거쳐 형성된 free radical이 세포외 기질대사에 영향을 주어 proteoglycan의 합성을 억제(Bates *et al.*, 1985 ; Schalkwijk *et al.*, 1985)할 뿐만 아니라 degradation을 촉진(Burkhardt *et al.*, 1986)시킴으로서 연골내 골화와 관절 연골형성에 장애를 유발케 하는데, 그 저해정도는 연골세포의 type와 분화단계에 따라 다르다(Jikko *et al* 1996).

위와 같이 이미 분화된 연골세포가 비만세포(hypertropic chondrocyte)로 성숙되는 단계에서의 X-선의 작용에 대해서는 잘 알려져 있다. 그러나 연골세포나 섬유아세포, 근육세포로 분화될 수 있는 미분화 간충직세포의 분화과정에 대한 연구는 잘 이루어져 있지 않아, 본 연구에서는 X-선이 간충직 세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지에 대해서 알아보고자 하였다. 실험결과 선량 의존적으로 분화를 저해하는 것으로 나타나 이에 보고하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 계배의 간충직 세포는 White Leghorn 종의 수정란을 37℃, 상대습도 60%의 조건에서 부란시킨 후, Hamburger-Hamilton stage 23/24의 계배 limb bud로부터 분리하여 사용하였다(Park *et al.*, 1990). 세포 배양용 시약들은 Giboco/BRL(Grand Island, NY, USA)로부터, 배양조는 Corning(New York, NY, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

HH-stage 23/24 계배 limb bud를 절취하여 Ca^{2+}-Mg^{2+} free saling G에 모으고 Ahrens 등(1977)의 방법에 준하여 미세대량 세포 배양법을 실시하였다. 즉 조직에 0.1% trypsin-collagenase를 37℃에서 10분간 처리하여 세포들을 분리시키고 10% fetal calf serum(FCS)과 항생제가 포함된 F-12 배양액을 가하여 반응을 정지시켰다. 분리된 세포들을 원심 분리하여 모은 후 배양액에 재현탁하고 2장의 #20 Nytex 여과지를 이용하여 세포현탁액을 거른 후 혈구 계산기를 이용하여 세포 수를 산정 하였다. 세포농도를 2×10^7 cells/ mℓ로 조정한 후 10 μℓ의 세포 현탁액을 35 mm 플라스틱 배양조에 심고 37℃의 CO_2 배양기에서 1시간 배양하여 세포들을 배양조 바닥에 붙도록 하였다. 이후 10% FCS가 포함된 F-12 배양액을 1.5 mℓ 가하고 X-선을 조사하였다. 배양액은 매일 갈아주었다.

2) X-선 조사

X-선 조사는 6-MV X-Ray Machine(Mevatron MD67, Siemens, GFR)을 이용하여, 최대선량점을 1.5 cm, field size를 가로 3 cm × 세로 3 cm의 크기로 조정하였다. 선원과 cell과의 거리를 1 m로 고정시킨 후 300 cGy/min의 선량율로 실험조건에 따라 각각 1 Gy, 3 Gy, 5 Gy, 10 Gy 순으로 상온에서 조사하였다.

3) 분화도 검정

중배엽성 간충직세포의 연골세포로의 분화도 검정은 Lev와 Spicer(1964)의 방법에 의한 cartilage nodule의 관찰과 연골세포에서 분비되는 sulfated proteoglycan을 alcian blue로 염색하여 정량하는 Paulsen과 Solursh (1988) 방법으로 수행하였다. 즉 배양된 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 수세한 후, Kahle's fixative solution으로 10분간 고정시킨 다음, 이것을 다시 PBS로 2회 수세하였다. 여기에 alcian blue(pH 1.0) 염색액을 가하여 24시간 동안 염색하였다. 염색 후 0.1 N HCl로 3회 수세하여 비특이적으로 결합된 염색액을 제거한 뒤, 현미경으로 관찰하면 sulfated glycosaminoglycan이 푸르게 염색된 cartilage nodule이 관찰된다. 분화도를 정량화 하기 위해 결합된 alcian blue를 4 M guanidine-HCl로 실온에서 12시간 처리하여 염색액을 추출하고, 이것을 ELISA reader(Titertek Multiscan Plus, Flow Lab)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅲ. 결 과

HH-stage 23/24 계배 사지를 떼내어 collagenase-trypsin을 처리하여 단일세포상태의 간충직세포를 얻고

이들을 2×10^7 cells/ml의 농도로 배양조에 심어 배양하였다. 세포를 배양하면서 배양 시기별로 세포를 Kahle's 고정액으로 고정한 후 alcian blue로 세포간질에 있는 sulfated proteoglycan을 염색하여 현미경으로 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양 1일에는 alcian blue의 염색이 약하였으나 배양 3일에는 alcian blue로 염색되는 nodule의 수가 증가하고 nodule의 염색정도도 진하게 되었다. 이것은 계배 사지의 간충직세포가 연골세포로 분화되고 있음을 보여주는 것이다. 이러한 연골세포 분화에 미치는 X-선의 영향을 조사하고자 배양 첫날 1-10 Gy의 X-선을 배양 간충직세포에 조사하고 배양 3일째에 alcian blue로 염색하였다. 그 결과 X-선의 선량이 커질수록 alcian blue의 염색이 점차 약해져 연골분화가 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 2). Sulfated proteoglycan에 결합된 alcian blue를 guanidine HCl로 추출하고 흡광도를 측정함으로써 양적인 분석을 실시하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 결합된 alcian blue의 양이 X-선의 선량이 증가할수록 감소함을 알 수 있었다. X-선이 세포 상태에 미치는 영향을 알아보기 위하여 X-선을 조사한 세포를 hematoxylin으로 염색하여 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 X-선의 선량이 증가할수록 hematoxylin에 의해 염색되는 세포의 수가 감소하는 것으로 나타나 X-선은 어느 정도 세포독성 효과가 있음을 알 수 있었다. X-선의 연골세포 분화 억제 작용 시기를 알아보기 위하여 배양 시기별로 X-선을 조사하고 분화도를 검정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 배양 기간 내내 X-선을 조사하였을 때 연골세포 분화는 거의 억제되었다. 배양 첫날에 X-선을 조사하였을 때는 매일 조사하였을 때 보다는 연골세포 분화 억제정도가 적지만 매우 크게 나타났으며 배양 시기가 지남에 따라 그 효과가 점차 감소하였다.

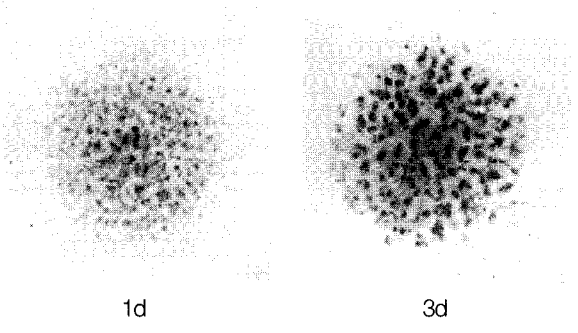

Fig. 1. Photomicrographs (x20) of chick limb bud mesenchymal cells during chondrogenesis.
Cells were micromass cultured for the indicated periods, fixed with Kahle's fixative, and stained with Alcian blue at pH 1.0.

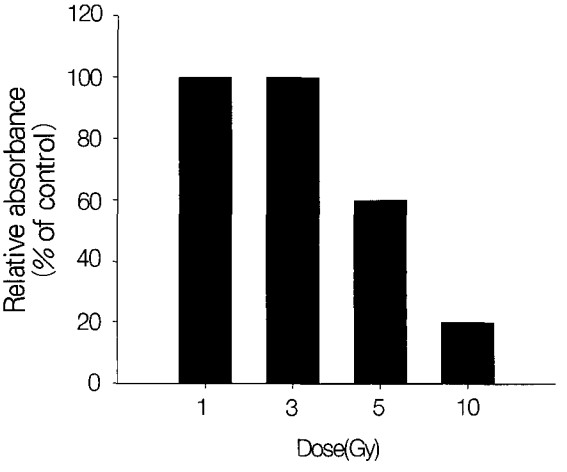

Fig. 3. Quantitation of chondrogenesis by reading the absorbance of bound Alcian blue.
Bound dye was extracted with 4 M guanidine HCL and optical density was measured at 595 nm.

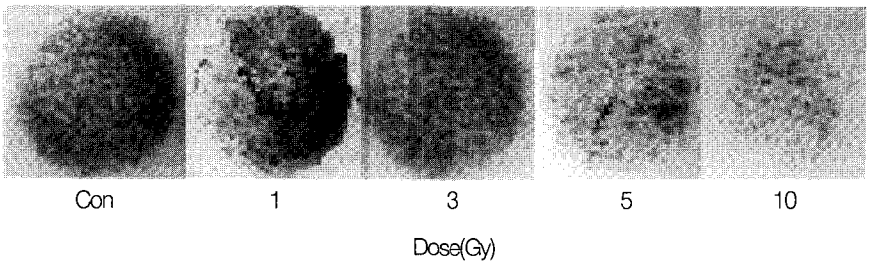

Fig. 2. Effects of X-irradiation during chondrogenesis in vitro.
Mesenchymal cells were irradiated at the doses indicated on day one and cultured for 3 days. Cells were stained with Alcian blue.

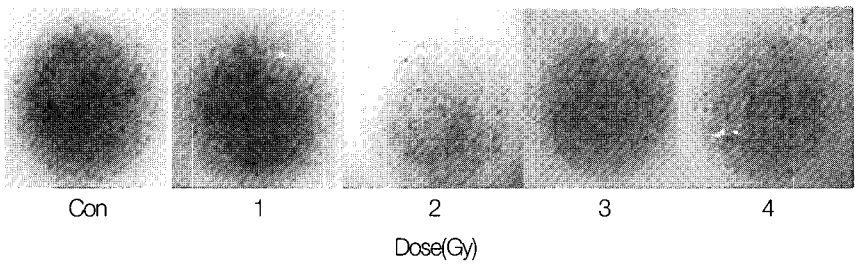

Fig. 4. Effects of X-irradiation during chondrogenesis in vitro.
Mesenchymal cells were irradiated at the doses indicated on day one and cultured for 3 days. cells were stained with hematoxylin.

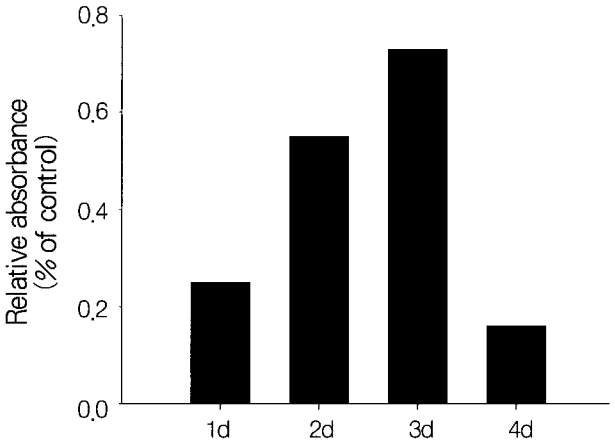

Fig. 5. The periods of effective action of X-irradiation on chondrogenesis of mesenchymal cells.
Mesenchymal cells were irradiated on one day (1d), 2 day(2d), 3 day of culture (3d) or every day during culture periods (1-3d).

IV. 고 찰

X-선 조사는 연골세포의 세포외기질 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 즉, 연골세포에 X-선을 조사하면 계 기관배양에서 경골연골로의[H^3] glucosamine의 incorporation이 저해되고(Cornelissen *et al.*, 1990), 계 흉연골의 기관배양에서는 콜라겐과 glycosaminoglycan의 합성이 저해된다(Cornelissen *et al.*, 1993). 관절연골은 비교적 방사선에 저항성이 있어(Pavelka *et al.*, ; Rubin *et al.*,)성숙한 관절연골세포에서는 X-선 조사에 의해 proteoglycan이나 type Ⅱ collagen의 대사가 영향을 받지 않는다(Matsumoto *et al.*, 1994). 그러나 미성숙 관절 연골세포에서는 X-선이 proteoglycan의 합성을 저해함으로서 연골내골화와 관절연골형성에 장애를 유발한다(Jikko *et al.*, 1996). 이와 같은 보고들은 연골세포의 분화단계에 따라 X-선의 효과가 다름을 시사한다. 본 연구에서는 계배 간충직세포를 배양하면서 X-선을 조사하였을 때 선량 의존적으로 분화가 억제됨을 보였다. 이 결과는 X-선이 간충직세포와 같은 성숙 이전의 연골성 세포들에게는 모두 영향을 미침을 보여주는 것이다. 또한 X-선이 연골세포의 성숙과정에 영향을 주기도 하지만 간충직 세포로 부터 연골세포로 분화하는 과정을 억제시키기도 함을 보여줌으로써 간충직 세포로부터 성숙된 연골세포로 되는 전과정에 X-선이 영향을 미친다는 사실을 알 수 있다. 그러나 X-선이 세포 내에서 어떤 신호경로를 거쳐 연골세포 분화 및 성숙 과정을 저해하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않으며 앞으로 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Sloursh, M. The role of extracellular matrix molecules in early limb development. Seminar in Dev. Biol. **1**:45-53(1990).
2. Daniels, K. and M. Solursh. Modulation of chondrogenesis by the cytokeleton and extracellular matrix. J. Cell Science **100** : pp.249-254(1991).
3. Jikko, A., H. Hiranuma, M. Iwamoto, Y. Kato, Y. Okada, and H. Fuchihata, H. Effects of X irradiation on metabolism of proteoglycans. *Radiat. Res.* **146** : 93-9(1996).
4. Suthereland, R. Basic Priciples of radiation biology, In : Clinicle oncology, 5th ed(Rochester Co), pp.296-314(1978).
5. Metter, F.A. and Upton, A.C. Ionizing Radia-

tion, 2nd ed.(Saunders Co.) pp.1-317(1995).
6. Bushong, S.C.(1984). Fundamental principles of radiobiology. In : Radiologic science for technologist, 3rd ed.(Mosby Co.), pp.425-504.
7. Fritz-Niggli, H. 100year of radiobiology : implications for biomedicine and future perspectives. Experientia. **51(7)**:652-664(1995).
8. Hall EJ, Astor M, Bedford J, Borek C, Curtis SB, Fry M, Geard C, Hei T, Mitchell J, and Oleinick N, Basic radiobiology. Am. J. Clin. Oncol. **11**:220-252(1988).
9. Limoli CL. Ward JF. A new method for introducing double-strand breaks into cellular DNA. Radiat. Res. **134**:160-169(1993).
10. Allen. D. J, Radiation induced apoptosis : its role in a MADCaT(Mitosis-apoptosis-differentiation-calcium-toxicity)scheme of cytotoxicity mechanisms. Int. J. Radiat. Biol. **62**: 145-152(1992).
11. Cohen-Jonathan E, Toulas C, Ader I, Monteil S, Allal C, Bonnet J, Hamilton AD, Sebti SM, Daly-Schveitzer N, Favre G, The farnesyltransferase inhibitor FTI-277 suppresses the 24-kDa FGF2-induced radioresistance in HeLa cells expressing wild-type RAS. Radiat. Res. **152**:404-411(1999).
12. Shimanovskaya. K and Shiman. A, Radiation injuries of growing bones. In Radiation Injury of Bone(Shimanovskaya. K and Shiman. A, Eds.), pp. 129-141. Pergamon Press, New York(1983).
13. Kolar. J, Vrabec. R and Chyba. J, Arthropathies after irradiation. J. Bone Joint Surg. 49-A, 1157-1166(1967).
14. Bates. E. J, Johnson. C.C and Uwther. D. A, Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. Biochim. Biophys Acta **833**:221-228 (1985).
15. Schalkwijk. J, von der Berg. W.B, von der Putte. B.A and Joosten. L.A.B, Hydrogen peroxide suppress the proteoglycan synthesis of intact articular cartilage. J. Rheumatol. **12**:205-210(1985).
16. Burkhardt. H, Schwingel. M, Menninger. H, Macartney. H.W, and Tschesche. H, Oxygen radicals as effectors of cartilage degradation. Arthritis Rheum. **29**:379-387(1986).
17. Jikko, A., Hiranuma, H., Iwamoto, M., Kato, Y., Okada, Y. and Fuchihata, H. Effects of X-Irradiation on Metabolism of Proteoglycans. Radiat. Res. **146**:93-99(1996).
18. Park, T. K., soon, J. K., Yoo, J. A., Yoo, B. J., and Kang, S. S. Studies on the differentiation of chondrogenic cells in developing chick embryo I. cellular aggregation and chondrogenesis. Kor. F. Zool. **33**:310-321(1990).
19. Lev, R., and Spicer, S.S. Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. J. Histochem. Cytochem. **12**:309(1964).
20. Paulsen, D. F. and M. Solursh. Microtiter micromass cultures of limb-bud mesenchymal cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**: 138-47(1988).
21. Cornelissen. M, Thierens. H and de Ridder. L, Dose-and time dependent radiaion inhibition of RNA and glycosaminoglycan synthesis in embryonic cartilage : an in vitro study. Int. J. Radiat. Biol. **57**:1007-1016(1990).
22. Cornelissen. M, Thierens. H and de Ridder. L, Radiation effects on the matrix synthesis in non-ossifying embryonic cartilage in vitro: a functional and morphological study. Tissue Cell **25**:343-350(1993).
23. Pavelka. K, Meier-Ruge. W, Muller. W and Fridrich. R, Histological study of effects of colloidal 90 yttrium on knee joint tissues of rabbits. Ann. Rheum. Dis. **34**:64-69(1975).
24. Rubin. P, Casarett. G and Farrer. P, The effects of intraarticular 198Au instillations on articular cartilage. Radiology **103**:685-690(1972).
25. Matsumoto. T, Iwasaki. K and Sugihara. H, effects of radiation on chondrocytes in culture. Bone **15**:97-100(1994).

The Effects of X-Irradiation on the chondrogensis of mesenchymal cells

Jong Ryeol Ha

Dept. of Diagnostic Radiology, Kyungpook National University Hospital

It is well known that X-irradiation affects on maturing process of differentiated chondrocytes. Nevertheless, It has been remained elusively whether X-irradiation affects the process of differentiation of mesenchymal cells which differentiate into chondrocyte, fibroblast, or muscle cells. In this study, we examined the effect of X-irradiation (with 1 to 10 Gy) on chondrogenesis using the mesenchymal cells of chick limb bud.

Our results show that X-irradiation dose-dependently inhibited chondrogenesis. This result suggests that immature chondroblast-like mesenchymal cells are sensitive to X-irradiation. Moreover, X-irradiation affects not only maturing process of chondrocytes, but also inhibits the chondrogenesis.

Taken together, we demonstrate that the whole process of differentiation of mature chondrocytes from mesenchymal cells is affected by X-irradiation and undifferentiated cells were more affected by X-irradiation than mature cells.

Key words : mesemchymal cell, differentiation, chondrogemesis