

감마방사선에 의한 암세포의 세포손상에 관한 연구

ABSTRACT

A Study of Cell Damage of Cancerous Cells by Gamma Radiation

Dept. of Radiology, Samsung Medical Center.

Surk Hwan Yoon

To evaluate the process of radiation-induced cell damage in human promyelocytic leukemia cell HL-60 cell and chinese hamster cell CHO cell lines, I irradiated HL-60 cells, CHO cell line, using the γ -radiation from Cs-137 cell irradiation(Gamma cell 3000 Elan, Nordion, Canada). HL-60 cells, CHO cells were irradiated flow low dose to high dose(0, 10, 20, 30 Gy). Cellular damage were evaluated by cell morphology, cell viability, DNA laddering, Comet assay and colony format efficiency. From them radiation induced cell damage was observed as follows :

- 1) Cell viability decreased and cell death increased as the radiation dose increased.
- 2) Apoptosis increased as radiation dose increased. In increased most significantly hours after irradiation.
- 3) DNA ladder can be identified in irradiation cells, however, it had no correlation with radiation dose on time after irradiation.
- 4) CFE(colony format efficiency) reduced radiation induced cell damage increased as dose increased.
- 5) Germanium Oxide reduced radiation protective effect induced cell damage.

In summary, rapidly increasing knowledge about the process of radiation-induced cell damage has opened up new horizons in radiation biology concerning the genetic control and pharmacological modification of the cellular response to irradiation. Most of them are transformed into water (H_2O) and carbon dioxide (CO_2), and are discharged from our body. But aging, stress, pollution and junk food etc influence metabolism badly and cause to produce such free-radical substances in surplus which harm / mutate cells and genes. When carcinogens combine with such damaged cells, it might be grown as cancer cell, much to our regret. Germanium is often called "edible oxygen", and is combined with 3 or 4 oxygen. Germanium helps to protect our body cells from the attack of free-radical substances and recover body fluids into ideal weak alkaline state giving its oxygen to cells.

Key Words : Cell damage, HL-60 cell, Germanium Oxide

I 서 론

방사선에 의해서 세포손상이 일어난다는 것은 잘 알려진 사실이다(Sankaranarayanan et al., 1995). 방사선은 에너지 흐름으로 이 에너지의 일부가 세포에 흡수될 때 생물 손상작용이 시작된다(Kadhim et al., 1995). 세포는 저 준위 방사선을 지속적으로 조사할 때 방사선에 대한 적응반응으로서 방사선에 의하여 유발되는 세포파괴 뿐만 아니라 변이완성에 대해 보호 작용을 나타낸다(Yonezawa et al., 1990; Cortes et al., 1990). 세포조사에 대한 지금까지의 연구대상이 주로 흥선세포 (Mark et al., 1988; Wyllie et al, 1980; Xiaoming et al., 1992), 면역세포, 상피세포, 조혈세포 등을 중심으로 연구되어져 왔을 뿐이다(Bories et al., 1995; Howard et al., 1995). 방사선 조사에 의하여 유발되는 Oxygen free radicals는 생리적 변화를 유도하여 DNA 손상을 유발하고 궁극적으로 변이완성, 발암, 세포독성 등의 다양한 생물학적 효과를 유발할 수 있다.

본 연구는 방사선조사로 세포가 세포고사라는 과정을 통하여 세포 사에 이르는지를 확인하고, 세포에서 방사선에 의해서 세포고사가 유도된다면 방사선량과 방사선 조사 후 경과시간에 따라서 어떻게 변하는지를 밝혀 보고자 하였다. 세포고사를 연구하기 위해 최근에 여러 가지 실험 방법을 서로 비교함으로서, 세포고사를 정확하고 편리하게 연구할 수 있는 방법을 찾아보고자 한다. 또한 본 연구에서는 HL-60 세포와 CHO 세포를 model system으로 하여 방사선에 의해 유도되는 세포손상에 의한 세포의 향상성유지에 기여하는 방사선 보호효과 연구에 기초 자료로 제공하고자 한다.

II 대상 및 방법

1. 시약

Diphenylamine(DPA)는 Merk 제품을, fetal bovine serum(FBS), DMEM는 GibcoBRL 제품을, 그리고 RPMI-1640, trypan blue, Giemsa solution, Agarose gel은 Sigma 제품을, Germanium(IV) Oxide는 Aldrich 제품을 사용하였다.

2. 세포 배양

사람 백혈병 세포인 HL-60 세포를 RPMI-1640 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum이 포함된 배양액에 부유시킨 후, 37°C, 5% CO₂를 유지시켜 주는 배양기에서 배양하였다. 세포는 T-75 배양용기에 2×10⁶ cell/15 ml로 맞추어서 이를 주기적으로 계대 해주었다. Chinese Hamster Ovary(CHO)세포를 trypsin-EDTA 1×10⁴ cell로 5분 처리 후 E-tube에 ml당 4×10⁶ cell로 맞추어 5일 후에 주기적으로 계대 배양하였다.

3. 감마방사선 조사조건

감마방사선 조사는 아주대학교의 Cs-137 세포조사기 (Gamma cell 3000 Elan, Nordion, Cannada)를 이용하였고, Gamma-ray(central dose rate = 52 Gy/h)를 각각 0 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy, 30 Gy씩 조사하였다.

4. 세포 생존율

배양된 세포 부유액 20μl에 0.4% trypan blue를 동량의 부피로 염색한 다음, inverted light microscopy (×100)에서 hemocytometer로 측정하였다. 여기에서 trypan blue로 염색이 되지 않은 세포를 살아있는 세포로 그리고 염색이 된 세포는 죽은 세포로 판단하였다. 세포의 생존율(%)은 각각의 실험 군에서 살아있는 세포 수에 대한 총 세포수의 비율로 계산하였다.

5. 실험방법

1) Diphenylamine assay

시약이 처리된 HL-60 세포를 PBS(10 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) 2회 세척한 후 lysis buffer (0.2% Triton X-100, 10 mM Tris, and mM EDTA, pH 8.0) 200μl를 첨가하고 상온에서 15분간 방치한 다음 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 분절된 DNA가 들어있는 상등액 200μl를 새로운 tube에 옮기고 침전물을 lysing buffer 200μl를 넣어 용해시켰다. 상등액과 침전물에 perchloric acid 0.5 M이 되도록 각각 첨가한 후 95°C에서 15분간 가열하였다. 그리고 DPA 용액(0.088 M DPA, 98% v/v glacial acetic acid, 1.5% v/v sulfuric acid, 0.5% v/v acetaldehyde solution) 400μl를 각각의 tube에 첨가하고 상온에서 약 14시간 동안 정치시켰다. 반응액은 96 well plates

에 200 μl 씩 옮기고, microplate reader(Bio-RAD, 450)로 570 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. DNA Fragmentation(%)은 다음과 같이 계산하였다.

DNA Fragmentation(%) =

$$\frac{\text{상등액의 흡광도의 값}}{\text{침전물의 흡광도 값} + \text{상등액의 흡광도 값}} \times 100$$

2) Comet assay

방사선 조사가 끝난 다음 손상된 DNA 분자의 수복을 방지하기 위하여 모든 절차는 4°C 하에서 이뤄졌다. 슬라이드 상에서 200 μl 의 1% agarose(Sigma)로 첫 번째 층을 입힌 다음 고체화시키고 그 위에 립프구들을 37°C에서 low melting point(LMP) agarose(Sigma)의 최적의 농도가 0.5%가 되도록 혼탁시키고 100 μl 로 두 번째 층을 덮는다(Fig. 2).

림프구가 포함된 두 번째 층을 간단히 고체화시킨 다

음 100 μl 의 0.5% LMP agarose를 사용하여 세 번째 층을 덮는다. 이렇게 주조된 슬라이드는 1% Triton X-100(Sigma)과 10% DMSO(Merck)를 사용하여 첨가한 colding lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-disordium, 10 mM Tris, pH=10)에 최소 1시간 동안 detergent로 high salt solution에 잠기게 했다. 이 단계에서 핵 안의 protein들을 모두 제거된다. 전기영동 전에 슬라이드는 higher pH(pH 13.5)로 된 알칼리성의 전기영동 용액(0.3 M NaOH, 1 mM Na₂ EDTA)에서 20분 동안 전기영동에 방해가 될 detergent를 제거하면서 평형을 유지 시켰고 동시에 DNA를 unwinding시켜 super coiling을 풀어주었다. 그 후 전기영동 다음에 슬라이드를 세척하고 0.4 M Tris buffer(pH 7.5)를 몇 방울 처리하여 5분간 중성화하고 다음의 염색 단계를 위해 이 과정을 2번 더 수행하였다. 그 후 buffer를 제거하고 50 μl 의 ethidium bromide(20 $\mu\text{l}/\text{ml}$,

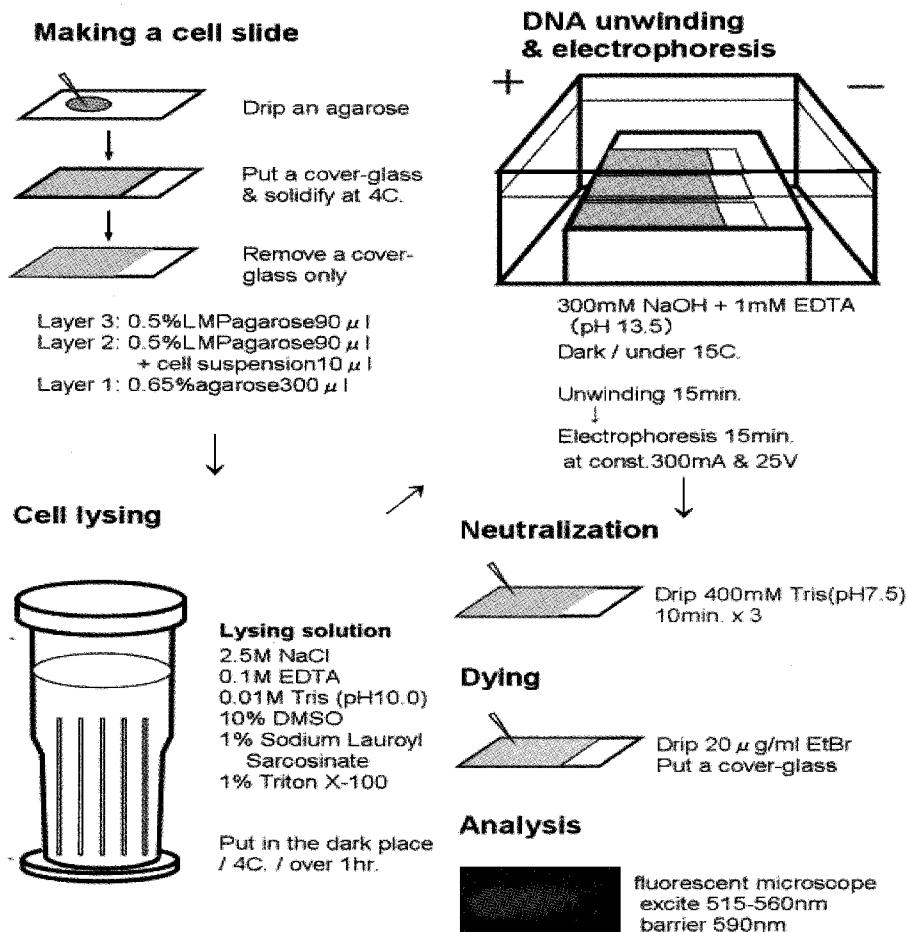


Fig. 2. Protocols of comet assay.

Sigma)로 염색하였으며 염색 결과 생성된 comet을 CCD camera(Hitachi Denshi, Ltd, Japan)가 부착된 형광 현미경(Olympus fluorescence microscope, Japan)에서 extraction filter(515~560 nm)와 barrier filter(590 nm)를 사용하여 x400으로 확대하여 검정하고, Image Analysis System Software(Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)를 통하여 분석하였다.

3) CFE(Colony Forming Efficiency) 측정

실험에 사용 된 세포 주는 CHO(Chinese hamster ovary)cell line을 사용하였다. CHO 측정은 radiation, a wide variety of chemical과 같은 돌연변이 물질을 연구하는데 널리 이용된다. CHO cell을 trypsin-EDTA 1×10^4 cell로 5분 처리 후 harvest하여 suspension 상태로 E-tube에 ml 당 4×10^4 cells로 넣고 chemical을 1h 전처리 하였다. 1h 전처리 후 radiation 조사를 하였다. radiation dose는 5 Gy(33")로 하였다. radiation 조사 후 1h incubation 시킨 후 각 tube에서 100 ul 씩 빼서 p60 plate에 FBS를 10% 첨가 한 DMEM medium과 함께 넣어주었다. plate는 5일 후에 incubator에서 꺼내어 Giemsa's stain(BDH Chemicals Ltd) 10% solution으로 staining을 하였다.

III 결 과

1. 감마방사선이 세포에 미치는 영향

감마방사선량에 따른 세포의 생존율의 변화를 관찰하기 위하여 감마방사선량을 각각 5, 10, 20, 30 Gy로 변화시키며 조사하였다. 방사선을 조사하고 24시간이 경과 한 후 세포생존율을 살펴보았다. 그 결과, 대조군에 비해 5 Gy 조사한 sample에서는 그 생존율이 50%로 떨어지는 것을 확인 할 수 있었으며, 방사선량이 높아짐에 따라 세포 생존율이 떨어지는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3).

감마방사선량을 각각 5 Gy와 10 Gy로 고정한 상태에서 1시간과 24시간이 지난 후 세포생존율을 조사하였다. 그 결과, 방사선량을 5 Gy 조사한 후 1시간 경과 시 약 90%의 세포생존율을 보였으며, 24시간이 경과한

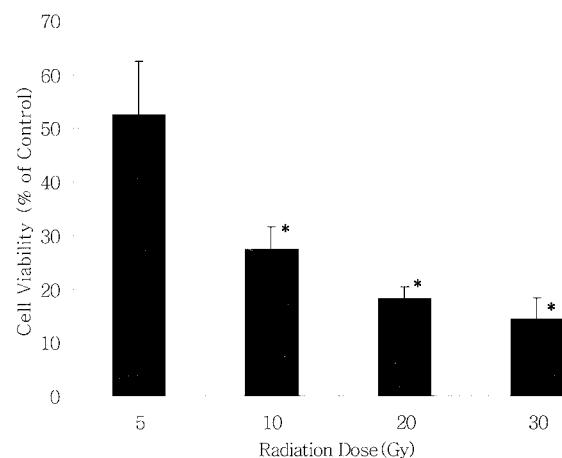


Fig. 3. Radiation-induced cell viability(%) assayed by trypan blue test according to radiation dose in HL-60 cells. Error bar=SE (n=4). *, P<0.05

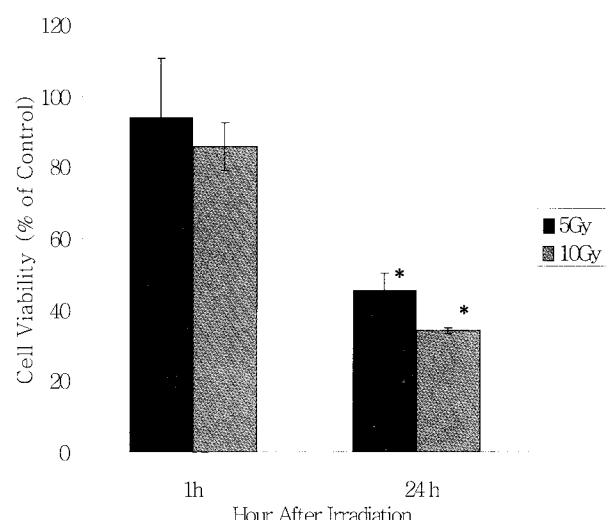


Fig. 4. Cell Viability(%) following Irradiation. Decreased with same pattern by trypan exclusion test HL-60 cells. Error bar=SE (n=4), *, P<0.05

후에는 약 50%의 생존율을 보였다. 마찬가지로 10 Gy를 조사한 후 1시간이었을 땐 약 80%의 세포생존율을 보였으며, 24시간 경과 후에는 약 35%의 세포생존율을 보였다(Fig 4). 따라서 방사선을 조사한 후 시간이 지남에 따라 세포생존율이 감소됨을 확인할 수 있었다.

5 Gy를 조사한 세포와 10 Gy를 조사한 세포 모두 24시간 경과 후의 생존율이 1시간 후의 생존율 보다 50% 이상 낮아지는 것을 알 수 있었다. 두 가지의 실험결과 시간이 경과함에 따라서 세포사가 일정한 비율로 나타나지 24시간 이후부터는 큰 변화가 없는 것으로 보아

방사선량과 시간에 따라서 세포사가 유도되며 결과적으로 이러한 세포사가 모두 세포고사에 의해 유도되는지 아니면 세포괴사(necrosis)가 함께 존재하는지의 구분이 필요하리라 사료되었다. HL-60 세포에서 감마방사선에 의해서 유도되는 세포사가 세포고사(apoptosis)과정을 겪는지를 알아보기 위해서 DNA fragmentation을 조사하였다.

감마방사선을 5, 10, 20 Gy를 조사하고 24시간 후 Diphenylamine method를 이용하여 DNA fragmentation을 살펴보았다. 그 결과, 대조군에 비해 감마방

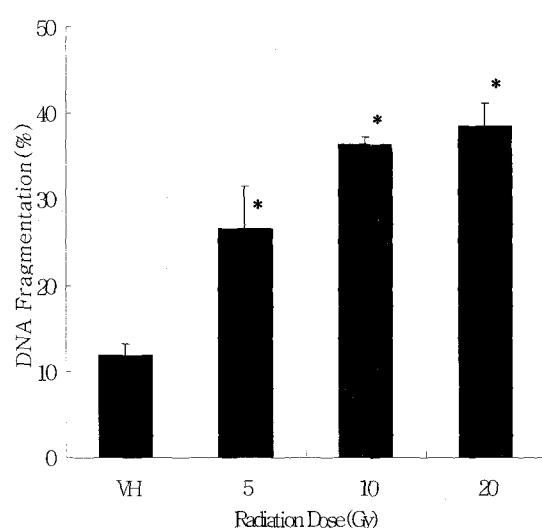


Fig. 5. DNA fragmentation was analyzed by diphenylamine methods described in materials and methods of irradiation apoptosis HL-60 cells. Error bar=SE ($n=3$). * $P<0.05$

사선을 5 Gy를 조사하였을 때 약 30%, 20 Gy일 때 약 40%의 DNA fragmentation을 나타내었다(Fig. 5).

따라서 방사선 조사 후 보다 시간이 경과한 다음 전기영동상의 형태를 관찰하게 되면 세포사의 과정을 알 수 있을 것이라 사료된다. 그러나 DNA fragmentation을 관찰하는 방법은 방사선 조사 후 시간의 경과와 방사선량에 따른 특이한 상관관계를 관찰할 수 없기 때문에 보다 정확한 DNA 변화를 관찰하기 위해서는 고사 세포만을 따로 분리하여 DNA 단편화를 정량화 하는 방법을 병행한다면 세포고사를 보다 정확하게 확인 할 것으로 사료된다.

Comet assay는 damage cell의 머리에서부터 꼬리까지 형광물질의 이동을 반영하기 때문에 tail moment 즉, 꼬리에서 DNA 퍼센트와 꼬리 길이의 결과는 DNA breakage를 측정하는 중요한 기준이다. 감마방사선을 각각(0, 5, 10 Gy) 조사하여 DNA 손상정도를 파악하였다.

Fig. 6-a. 6-b에서와 같이 5 Gy를 조사한 결과 1.5

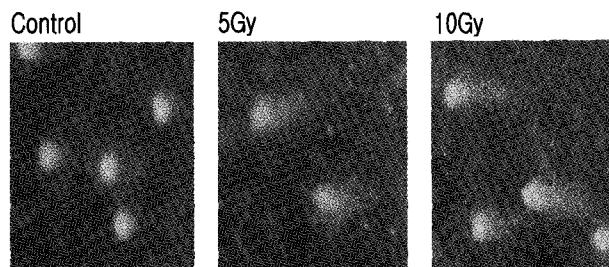


Fig. 6-b. Camera gray level image of HL-60 cells comets assay captured with intensified target camera.

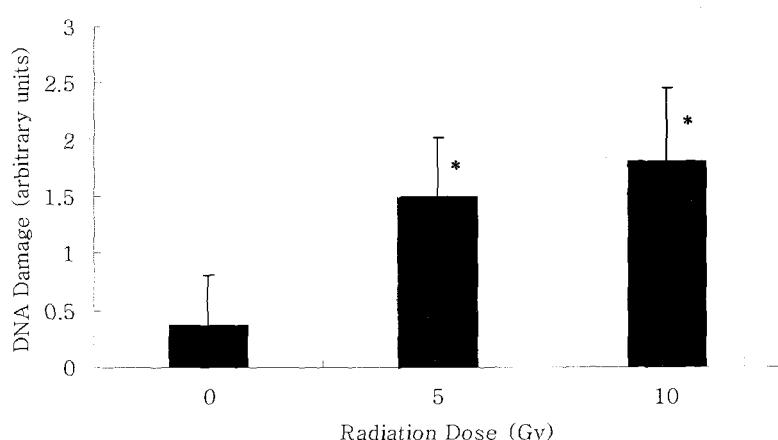


Fig. 6-a. DNA damage by after irradiation 5Gy, 10Gy the Comet assay HL-60 cell. Error bar=SE ($n=3$), * $P<0.01$

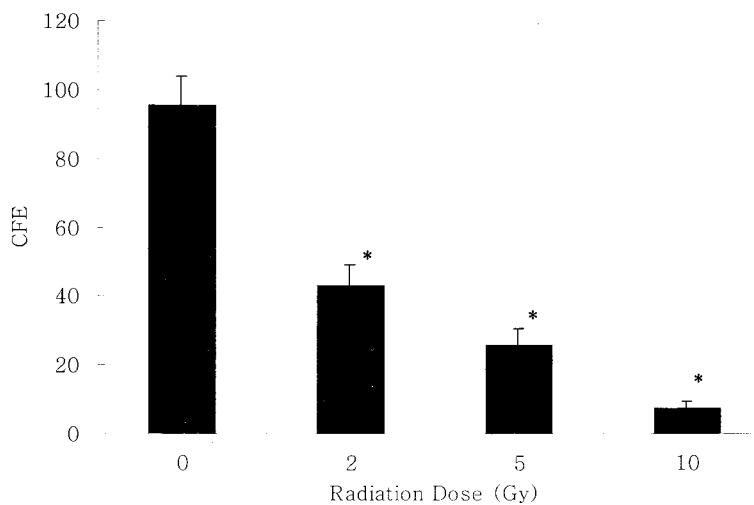


Fig. 7. Colony format efficiency following γ -radiation in Chinese hamster ovary cells. Error bar=SE ($n=3$), * $P<0.05$

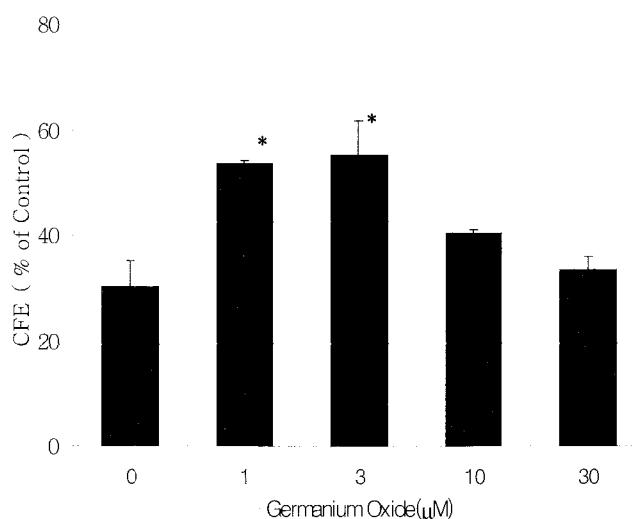


Fig. 8. Change of radiation protect effect in Germanium oxide treated CHO cells after irradiation(5 Gy) Error bar=S.E , ($n=3$). *, $P<0.05$

damage tail 정도 늘어나지만 10 Gy 조사시에는 많은 형광이 관찰되었고 이에 DNA 손상정도가 더 늘어나는 것을 알 수 있었다. 감마방사선 선량에 따른 생존이 가능한 세포의 클론 형성은 시간을 고정하고 0, 2, 5, 10 Gy의 dose로 방사선을 조사하였고, 조사 전에는 absolute CE가 50% 이하여야하는 아니 된다. 감마방사선을 0, 2, 5, 10 Gy을 조사하고 24시간 후 CFE(Colony Format Efficiency)를 살펴보았다(Fig. 7).

그 결과, 대조군에서는 90%의 colony가 형성되는 반면에 10 Gy를 조사하였을 때 10% 이하로 급격하게 변화하는 것을 확인 할 수 있었다. 선량이 증가 할 수록

세포의 colony는 증가됨을 확인하였고, 이 결과 Cytotoxicity는 증가됨을 알 수 있었다.

2. 감마방사선에 대한 Germanium Oxide의 방사선 보호효과

감마방사선 조사에 대한 protection effect를 보기 위한 실험으로 감마방사선 5 Gy 상태에서 germanium oxide를 dose별로 처리 한 결과 protection이 일어난 것을 볼 수 있었다(Fig. 8). VH 100에 대해서 chemical 을 처리하지 않은 것과 비교해보면 5 Gy는 30.3% 정도

의 colony가 형성 된데 반해 germanium oxide 1 μM에서는 53.7%, 3 μM에서는 50.2%, 10 μM에서는 40.6%, 30 μM에서는 37.12%의 빈도를 보였다.

다시 말해서 chemical을 처리하지 않고 감마방사선을 5 Gy 만 조사한 group에 비해서 germanium oxide를 처리하고 5 Gy 감마방사선을 조사한 group의 colony 형성 빈도가 높게 나타남을 알 수 있다. 이것으로 germanium oxide가 radiation에 대해서 protection effect가 있다고 볼 수 있다.

IV 고 칠

인체 위 점막 상피세포에서도 방사선 조사량이(2, 4, 6, 8, 10, 12 Gy)로 증가할수록 생존율은 감소되었고 (Yamagihara et al., 1995). 자외선 조사에 의한 피부 조직의 손상으로 나타나는 화상세포(sunburn cell) 역시 자외선 조사선량과 시간이 경과됨에 따라 증가된다 고 보고되었다(Kay and Edward, 1995). 결국 방사선 조사로 인하여 HL-60 세포의 생존율 감소는 세포고사가 증가됨을 알 수 있었다. 한편, 방사선에 의해 DNA 가 손상됨으로써 세포주기가 변하고 돌연변이가 유발되기도 한다. 이때 체내에서는 DNA 수복이나 세포고사와 같은 과정을 통하여 손상된 DNA를 제거하므로 생체를 보호한다고 알려져 있다(Woodcock and Magnus, 1976). 단세포 갤 전기영동법을 이용하여 립프구의 DNA 손상을 평가하는 데는 단순히 전기영동 후 나타난 DNA 혜성의 tail length를 측정하여 평가하는 기준으로 삼기도 한다. 그러나 단순 측정된 tail length 만을 사용할 경우 실제 DNA 분자 상에 유발된 손상이 지나치게 확인 해석될 수 있는 단점을 안고 있다. X-선에 대해서 0.01 Gy의 검출하한 선량으로 보고하였다(Plappert et al, 1995). 감마방사선 검출 하한을 0.001 Gy로 보고하였다(Singh et al, 1995). 선량 변화에 따른 DNA 손상 유발은 세포고사의 범위임을 알 수 있다. 또한 Comet assay는 고등동물세포에 대한 화학적, 생물학적 손상을 평가하는 새로운 기법으로 다른 기존의 DNA 손상평가 방법보다 민감하고 신속하며 쉬운 방법이다. 인체 세포들이 신진대사를 계속 반복적으로 행하려면 영양소와 산소가 절대필요하며, 산소 부족 시 만성일산화 탄소 중독증, 빈혈, 혈관장애, 심장장애, 저혈압, 세포노화, 정신장애 등의 질환이 발생한다. 최근에 와서 의학자들

의 실험에 의해 게르마늄은 산소의 효율적인 활용을 돋는 산소 촉매제의 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. 즉 인체에 유기 게르마늄을 공급하게 되면 여분의 산소는 혈액에 생명력을 공급하기 때문에 만성 산소 결핍 현상에서 벗어나게 된다는 사실이 현대 의학에 의해 밝혀지게 되었다. 본 연구는 Germanium oxide가 세포 손상에 대한 방사선 보호 작용이 있음을 확인하였다. 특히 사람 세포에 대한 방사선의 영향을 신속하고 정량적으로 평가 할 수 있기 때문에 특정물질의 방사선 방어 또는 민감화 효능의 평가는 물론 방사선 피폭자에 대한 세포의 생물학적 손상에 유용하게 활용 될 수 있을 것 이라 사료된다.

참고문헌

- Bories J.C., Willerford, D.M., Grevin D, Davidson L, Camus A, Martin P, Stehelin D, Al F.W., 1995, Nature. 377:150-155
- Cortes F., Dominguez I., Pinero J. and Mateos J. C., 1990 Mutagenesis 5:555-557
- Howard L.L., 1995, Cancer Res. 55:12-15
- Kadhim M.A., Lorimore S.A., Tolwncsend D.M.S., Goodhead D.T., 1987, Ann N.Y., Acad. Sci. 79:215-219
- Mark M.C., Stephen H.J. and John A.C., 1988, J. Endocrinol. 122:2158-2164
- Sankaranarayanan K. and Chakraborty R., 1995, Radiat. Res. 143:121-143
- Singh N.P, Graham M.M., Singh N.P. and Kahn A.N., 1995, Int. J: Radiat. Biol. 68:563-569
- Plappert U., Raddatz S. and Fliedner T.M., 1995. Stem. Cells.13:215-222
- Wyllie A.H., 1980, Nature. 284:555-556
- Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L. and Dunlop., 1984, J. Pathol. 142:67-77
- Woodcock A., Magnus I.A., 1976. Br. J. Dermatol, 95:459-468
- Xiaoming S., Roger T.S., David D., Michael G.O., Gerald M.C., 1992, nalytical Biocem. 204:351-356
- Yanagihara K., Nii M., Numoto M., Kamiya K., Tauchi H., Sawada S. and Seito T., 1995, Int. J. Radiat. Biol. 67:677-685
- Yonezawa M., Takeda A. and Misonoh J., 1990, J. Radiat. Res. 311:256-262