

## 방사선 조사선량에 따른 생쥐 난소의 TUNEL 염색반응에 관한 형태학적 연구

윤 철 호<sup>1</sup>, 장 병 수\*

<sup>1</sup>동남보건대학 방사선과, 한서대학교 보건학부 피부미용학과

### Morphological Study on the TUNEL Reaction of Mouse Ovary by X-ray Irradiation

Chul Ho Yoon<sup>1</sup> and Byung Soo Chang\*

<sup>1</sup>Department of Radiology, Dongnam Health College, Suwon, Korea

Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea

(Received May 20, 2007; Accepted June 18, 2007)

#### ABSTRACT

This research investigated morphological changes of ovarian follicle according to dose of irradiation when adult mice were exposed to X-rays from 6 MeV LINAC. At day 3 after irradiation of 200 cGy, 400 cGy and 600 cGy X-ray to the hole body of mice, the ovaries collected and stained with TUNEL. The normal follicles and atretic follicles were identified to apoptosis by the staining with TUNEL. In the atretic follicles of the normal ovary, the apoptotic bodies were well appeared and stained brown color. Almost of the follicles following irradiation are stained with TUNEL, but the sensitivity of reaction is weaker than that in irradiation of 400 cGy and 600 cGy X-ray. The granulosa cells of the radiated normal follicle by 400 cGy are shown brown color. In this stage, the nucleus of granulosa cells in the atretic follicles are condensed and picknotic feature. The size of the radiated follicle by 600 cGy are decreased than the normal follicles. The atropic follicles are filled with apoptotic bodies which change of granulosa cells and theca cells by influence of X-ray. All of cell in the follicles are strongly positive stained with TUNEL by irradiation of 600 cGy.

**Keywords** : Apoptosis, Granulosa cell, Ovarian follicle, Mouse, X-ray

#### 서 론

이온화 방사선을 세포에 조사하면 방사선 종류에 관계없이 생체 조직 내에서 물리, 화학적 변화를 초래

한다. 물리적으로는 여기와 전리현상에 의해서 세포의 변화가 일어나고, 화학적으로는 이온쌍과 자유라디칼 (free radical)이 생성되며 그에 따라 대사적 교란을 초래한다(Zyuzikov et al., 2001). 즉, 세포에 방사선 에너지를 조사시키면 조직의 구성 분자 내에서 물리적 변

\* Correspondence should be addressed to Dr. Byung Soo Chang, Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea. Ph.: (041) 660-1584, E-mail: bschang@hanseo.ac.kr

화 단계를 거쳐 수소 유리기(hydrogen radical  $\cdot H$ )와 수화전자(hydrated electron,  $e^-_{aq}$ ) 및 수산기(hydroxyl radical,  $\cdot OH$ )와 같은 1차 유리기들이 형성되며 (Singh & Singh, 1982), 일차적으로 생성된 유리기들은 용존 산소나 기타 물질들에 의해서 여러 반응단계를 거쳐 2차 유리기들(superoxide radical, hydrogen peroxide, alkoxy radical, peroxy radical)을 생성하게 된다 (Ozkan et al., 2001).

이러한 유리기들은 세포 내에서 단백질의 SH기나 DNA와 반응, 화학결합의 절단이나 가교 결합의 형성 등 생체구성 분자의 구조적 변화를 야기시키고(Fridovich, 1986), 이로 인해 효소 활성화의 저하와 DNA, 지질 및 단백질 등이 손상될 뿐만 아니라 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질의 산화가 유발된다(Emerit & Chaudiere, 1989; Kim & Lee, 2000). 과산화지질의 증가는 세포의 산화적 손상을 일으키며 이것은 기관의 생리적 기능 장애 유발과 질병을 초래하고, 노화와 유전적 질병의 원인이 되는 것으로 보고되었다(Bowman, 1986).

그리고 핵과 리보솜 및 미토콘드리아처럼 세포내 중요한 세포 소기관에서 광자에너지의 흡수와 산란 및 축적에 의해 세포장해를 유발하며 마침내 세포 및 생체에 치사 효과를 가져오는 동시에 방사선 급성 장애를 일으킨다. 이러한 세포의 장애는 생물학적인 활성물질의 국소적 합성과 분비 그리고 수용체에 대한 다양하고 광범위한 측정으로 확인 할 수 있다.

이온화 방사선을 세포에 조사하면 세포의 증식억제, 사멸, 괴사, 돌연변이 등의 변화가 나타나는데 세포사멸의 경로는 크게 두 가지로 나타난다. 세포사멸은 세포예정사(apoptosis)와 괴사(necrosis)로 구분하는데 이것은 사멸되는 세포들의 형태학적, 생화학적, 분자생물학적 차이로 구분하고 있다. 세포예정사는 능동적 세포사멸, 세포자살 및 계획된 세포 죽음(programmed cell death) 등으로 분리하고 있다. 즉, 세포막이나 세포 소기관 등이 정상적인 형태를 유지하면서 우선 핵내의 염색질이 응집하며 세포전체가 위축되면서 단편화되며 apoptotic body를 형성하고 세포사까지 이르는 경우를 말한다. DNA의 단편화 즉, 뉴클레오솜 사이에서 DNA가 무작위로 절단되는 현상이 일어나고 그 DNA를 추출하여 전기영동하면 약 200 염기쌍 마다

사다리 모양의 패턴이 나는 것이 특징이다.

이에 비해 세포괴사는 세포가 죽을 때 핵농축, 핵붕괴, 핵용해, 원형질액화 등, 핵, 세포질, 세포간질에 각종 붕괴과정이 생긴다. 세포붕괴에 따라 방출된 가수분해 효소나 단백질 분해 효소의 작용에 의해서 괴사를 일으킨다. 괴사는 그 원인, 조직의 종류, 주위의 상황에 따라 응고괴사(coagulation necrosis), 액화괴사(liquifaction necrosis), 건락괴사(caseous necrosis), 지방괴사(fat necrosis), 괴저성괴사(gangrenous necrosis) 등으로 나타난다.

세포예정사 현상은 괴사에서 나타나는 세포자체의 팽창 없이 세포 소기관, 특히 미토콘드리아와 세포막이 파괴되기 전에 오히려 수 분내지 수 시간 동안 세포용적이 다소 작아지며 염색질의 응축 또는 분절화 양상 등이 일어난다. 이는 개체나 장기의 발달 또는 퇴화과정에서 특정 조직들이 선택적으로 도태되는 것이다(Kerr et al., 1987).

세포자연사를 일으키는 인자들은 세포에 특이적으로 작용하기 때문에 서로 다른 세포들에서 일어나는 세포자연사 과정은 초기에 각기 다른 단계를 거치나, 궁극적으로 endonuclease의 활성화로 인하여 비가역적으로 세포가 죽음에 이른다. 세포자연사를 억제하는 생존요소로서 다양한 성장인자들의 작용을 설명하는 많은 연구가 있어왔다. 이러한 성장인자들로서는 epidermal growth factor (Hassell & Dratt, 1977), erythropoietin (Koury & Bondurant, 1990), insulin like growth factor-1 (Barres et al., 1992), activin (Schwall et al., 1993), transforming growth factor- $\beta$  (Lin & Chou, 1992), gonadotropin (Billing, 1993) 등이 보고되고 있으며 이러한 성장인자들은 난소의 난포 내에 다량으로 존재하고 있으며 이들을 난소 내 국부 조절인자라 부른다.

세포 사멸은 에너지를 필요로 하는 능동적인 과정으로 세포성장인자의 결합, 수용체에 대한 배위자(Ligand)의 결합, 반응기 산소 대사물, 이온화 방사선에 의한 DNA손상 등 세포에 대한 여러 자극에 의하여 유발된다(Collins & Lopez-Rivas, 1993; Nagata et al., 1994). 세포내 골격구조의 변화는 사멸세포의 원형질막의 blebbing도 초래하는데(Wyllie, 1980; Cotter et al., 1992), actin과 actin-결합 단백질인 fordrin의 분해가 이러한 원형질막의 변화를 일으킨다고 생각되고

있다.

최근에 세포예정사에 관한 많은 연구들이 이루어지고 있지만, 아직까지 세포예정사의 시작이나 전개 과정 및 최종적인 변화과정에 대하여 면역조직화학적 연구는 미흡한 상태이다.

본 연구는 임상에서 암 치료를 위하여 200, 400, 600 cGy의 X-선을 조사하는 것과 같은 조건으로 생쥐에 조사한 후 3일간 사육한 다음 적출한 난소에서 난포세포의 세포사 특성을 면역조직화학적 방법으로 수행함으로써 세포사 판정의 기준을 제시하고 조사선량에 따른 세포의 형태학적 변화과정을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 SD생후 5주차 암컷 ICR생쥐를 사용하였다. 사육은 12/12시간(light/dark) 조명하에서 사료와 물을 상시 공급해주면서 1주일 이상 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

### 2. 실험군 처리 및 방사선 조사

생후 5주차 암컷 생쥐 3마리씩을 5개 군으로 나누어 X-선을 각각 200, 400, 600 cGy를 전신 조사하고 3일간 사육한 다음 난소를 적출하여 실험에 사용하였다. 생쥐에 X-선 조사를 하기 위한 고정, 즉 SAD 변화를 막기 위하여 고정 상자를 제작하였다. 고정상자는 3마리의 생쥐가 X-선 조사면 내에서 제한적인 좌우 움직임은 가능하지만 상하의 거리 변동을 줄이기 위하여 상자 윗덮개를 생쥐의 크기에 고정시켰다.

X-선 조사기기는 경인지역에서 현재 암 치료에 이용되고 있는 미국 Varian사의 CL 2100 C/D 선형가속기를 이용하였으며 불필요한 skin sparing effect를 방지하기 위하여 X-선 에너지는 6MV photon beam (X-선)을 이용하였다.

실험조건은 실내온도 25.5°C 기압은 755 mmHg 상태에서 Dose rate는 200 Gy/min이었고 SAD는 100 cm, FS은 25×25 cm, SC factor는 1.038, tray factor는 0.970, SAD factor는 1.030이었다. SD 생후 5주차 암컷

생쥐의 평균두께는 4 cm (mid depth 2 cm)로 하였으며 방사선 조사는 POP (parallel opposed pair)로 조사하였다.

X-선 조사방법 및 선량은 200 cGy를 A-P로 100 cGy, P-A로 100 cGy로 조사하였고 이때의 MU 값은 97 (AP/PA)이었고, 400 cGy 조사시는 A-P로 200 cGy, P-A로 200 cGy로 조사하였고 이때의 MU 값은 194 (AP/PA)였다. 600 cGy 조사에서는 A-P로 300 cGy, P-A로 300 cGy 조사하였고 이때의 MU 값은 291 (AP/PA)였다.

### 3. TUNEL 염색

난포에서 세포예정사를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediate dUTP-digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) 방법을 이용하는 in situ apoptosis detection Kit (Apoptag; Oncor.)를 사용하였다. 난소조직을 paraformaldehyde (4%)에 고정하여 paraffin을 침투시켜 6µm 두께로 박절했다. 준비된 조직절편은 xylene으로 paraffin을 제거하고 alcohol과정을 거친 다음 수돗물에 수세하였다.

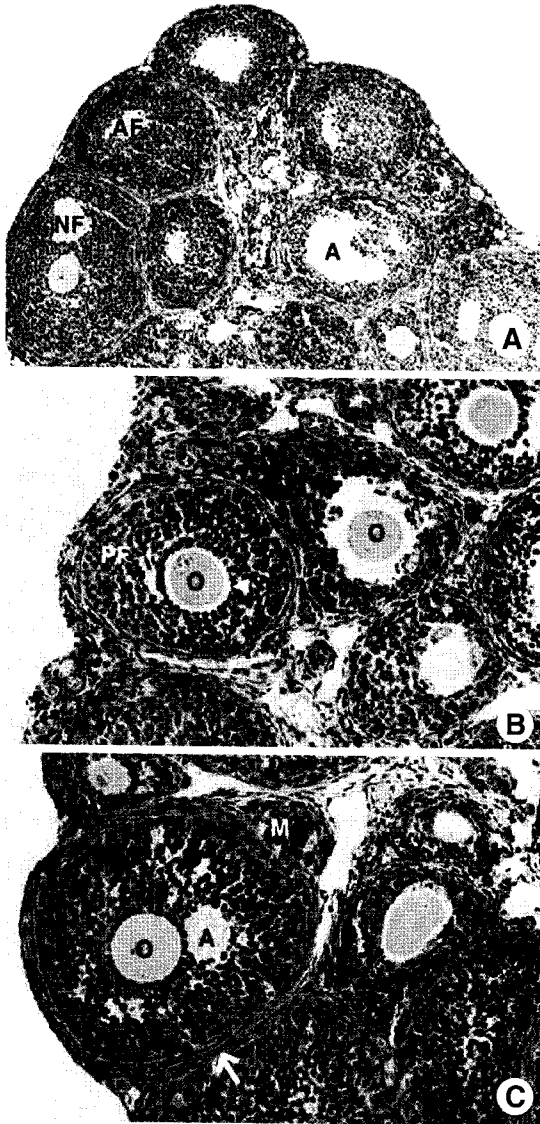
수세가 끝난 조직 절편을 Tris 완충액 (pH 7.6)으로 세척한 후 조직 내의 endogenous peroxidase를 제거하기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%)로 실온에서 30분간 처리하였다. 증류수에 수세한 후 Tris 완충액이 담긴 3개의 용기를 각각 5분씩 거쳤다. Apoptag Kit에 포함 되어 있는 equilibration 완충액으로 15분간 처리한 다음 TdT를 첨가하여 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위해 반응정지 완충액에 조직절편을 넣고 상온에서 30분간 처리한 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. Tris 완충액에서 꺼낸 조직절편을 anti-digoxigenin-peroxidase로 실온에서 30분간 반응시킨 후, Tris 완충액으로 세척하고 DAB (0.1% in Tris)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.002%)가 혼합된 용액으로 1분간 발색시켜 증류수로 세척하고, methyl green (0.5%)으로 30분간 배경 염색을 실시하여 관찰하였다.

## 결 과

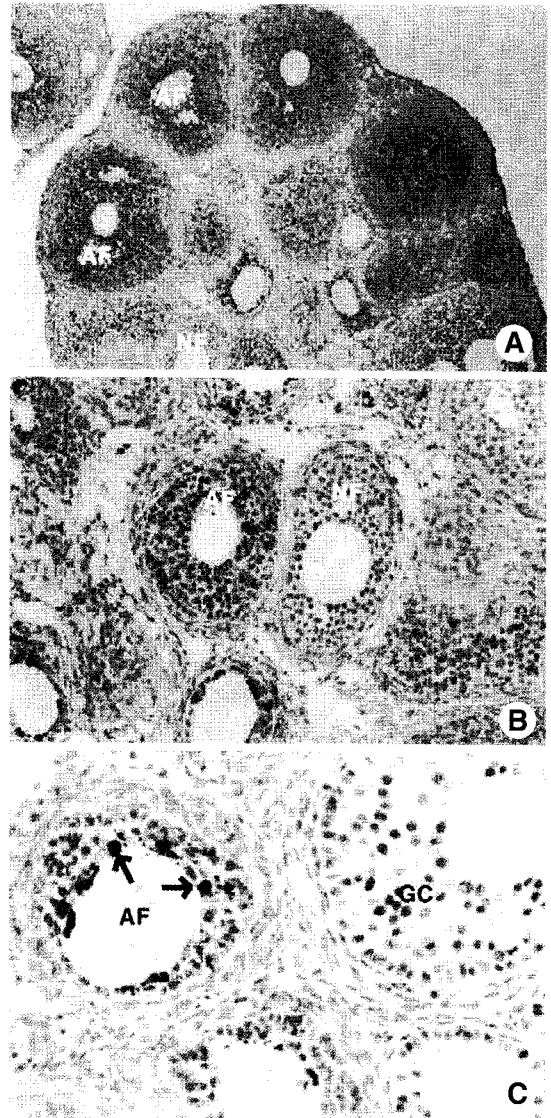
포유류의 난소는 수질 (medullary region)과 피질

(cortical region)로 구성되어 있다. 수질은 성긴결합조직으로 혈관이 풍부하게 존재하고 있으며 피질은 난자를 함유한 난포들이 주를 이루고 있다. 이들 피질과

수질에는 뚜렷한 경계가 존재하지는 않는다. 난소의 표면은 단층편평상피 (simple squamous epithelium) 또



**Fig. 1.** Light micrographs of normal mouse ovary. Paraffin-embedded tissues were sectioned with the thickness of 5  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin-eosin. A is a part of ovary showing atretic follicle (AF), normal follicle (NF). B and C are magnification of preantral follicle (PF) and antral follicle. O: oocyte, A: antrum, Arrow: theca, Arrowhead: zona pellucida, M: medulla. Original magnification: A =  $\times 40$ , B =  $\times 200$ , C =  $\times 200$ .



**Fig. 2.** Photo micrographs of normal mouse ovaries stained TUNEL immunohistochemistry (A, B, C). Paraffin-embedded tissues were sectioned with the thickness of 5  $\mu\text{m}$ . The normal follicles (NF) and atretic follicles (AF) were well shown. In the normal follicles (NF) of panel B, mitotic granulosa cells (GC) are shown and apoptotic cells were not observed. In the atretic follicles (AF) of panel C, the apoptotic bodies (arrow) are well appeared and stained brown color. GC: granulosa cells. Original magnification: A =  $\times 100$ , B =  $\times 200$ , C =  $\times 400$ .

는 단층 입방상피 (simple cuboidal epithelium)로 구성된 생식상피 (germinal epithelium)들이 둘러싸고 있다. 난포 (follicle)는 과립세포 (granulosa cell)들이 한 층 또는 여러 층으로 난자를 둘러싸고 있는 구조를 하고 있다. 정상 발육된 생쥐의 난소에서 다양한 성장시기의 난포들이 관찰되었다 (Fig. 1-A, B, C).

정상난포와 퇴화난포에서 세포예정사가 발생하는 것을 확인하기 위해서 TUNEL 염색을 실시하였다 (Fig. 2-A, B, C). 난소의 난포에서 과립세포 핵의 이상 응축 현상을 확인하기 위한 TUNEL 염색에서 정상난포의 핵은 전혀 반응이 일어나지 않았다. 정상난포의 과립층세포의 핵은 일부 유사분열을 진행하고 있었으며, 세포의 배열도 일정하게 유지하고 있었다 (Fig. 2-B). 그러나, 퇴화난포에서 과립층세포들은 세포예정사가 진행되고 있는 것이 확인되었다. 이들 세포들은 핵이 응축되어 있었으며, 그 결과로 apoptotic body들이 난포 내에 다량 산재하고 있는 것을 확인하였고, TUNEL 염색에서 양성을 보이는 세포들은 갈색을 띠고 있었다 (Fig. 2-C).

생쥐의 난소에 각각 200, 400, 600 cGy를 조사한 후 3일간 사육한 다음 절취한 조직을 TUNEL 염색을 실시하였다 (Fig. 3-A, B, C). 각각의 방사선 조사량에 따른 난포 구성세포의 세포예정사 규모와 정도를 TUNEL 염색을 통하여 확인하였으며, X-선 조사를 받은 난소의 난포는 정상대조군에서 보다 그 크기가 비례적으로 작아지는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 X-선 조사에 의해서 난포를 구성하는 과립층세포와 난막세포들의 세포예정사가 현저하고 신속하게 일어나는 증거임을 확인할 수 있었다.

200 cGy를 조사한 난포는 구성세포 모두에서 TUNEL 염색에서 양성반응을 보이는데 난포세포 전체가 갈색을 띠었고, 핵의 이상 응축현상도 관찰되기 시작하였다 (Fig. 3-A). 그러나, 이 시기에서 난소조직 전체의 염색도 차이는 400와 600 cGy를 조사하였을 때의 난소조직보다 비교적 낮게 나타났다.

400 cGy를 조사한 난소의 난포에서 퇴화난포는 난포를 구성하는 세포 모두가 TUNEL 양성반응으로 나타났다고, 난포 내 대부분의 세포의 핵은 응축되어 염색도가 강하게 나타났다. 또한, 퇴화난포 대부분은 모양

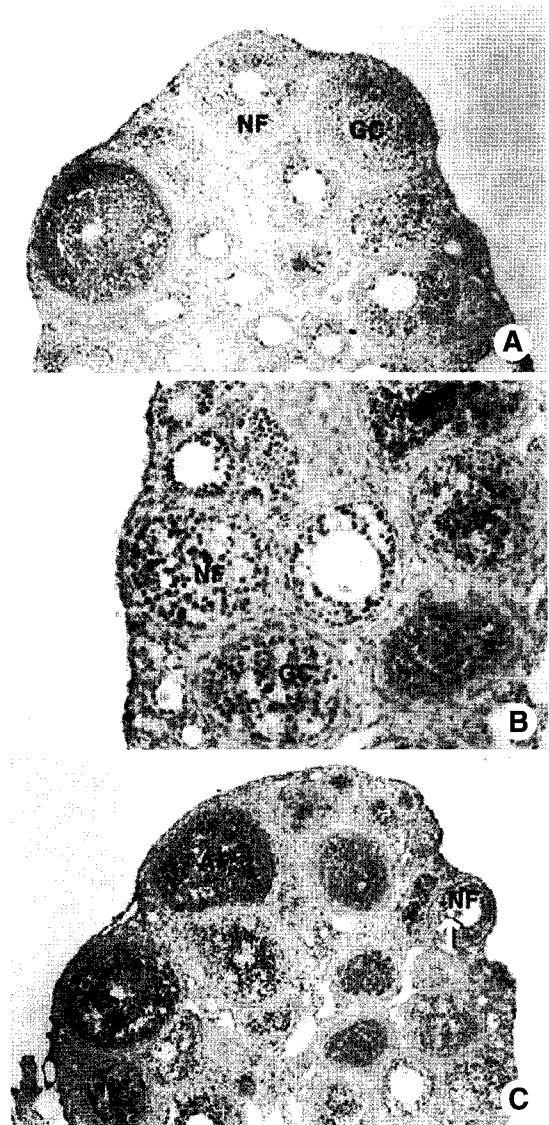


Fig. 3. Photo micrographs of mouse ovaries stained TUNEL immunohistochemical method after 3 days following irradiation of 200 cGy (A), 400 cGy (B), 600 cGy (C). In the ovary after 3 days following irradiation of 200 cGy (A), almost of the follicles are stained with TUNEL. The granulosa cells (GC) of the radiated normal follicle (NF) by 400 cGy (B) are shown brown color. In the panel (C). The atrophic follicles are filled with apoptotic bodies (arrows) which change of granulosa cells and theca cells by influence of X-ray. White arrow: Apoptotic nucleus of oocyte. Original magnification: A =  $\times 100$ , B =  $\times 200$ , C =  $\times 100$ .

이 일정하지 않고 찌그러진 상태로 관찰되었다(Fig. 3-B).

600 cGy를 조사한 난소는 조직전체가 TUNEL 염색에 강한 양성반응이 나타났다(Fig. 3-C). 정상난포는 난자를 둘러싸고 있는 과립층세포들이 모두 염색되어 갈색으로 나타났으며, 난자의 핵도 염색되었다. 이 시점에서 600 cGy의 X-선 조사에서 난모세포도 이미 세포예정사가 진행되어 파괴되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 난포막을 형성하고 있는 난막세포의 핵들도 양성반응을 나타내어 갈색으로 염색이 되었으며, 수질의 결합조직세포들의 핵도 갈색으로 염색되어 관찰되었다. 600 cGy를 조사한 난소의 퇴화난포에서 대부분의 세포들은 세포예정사가 진행되어 있었으며, apoptotic body들이 난포 내에 산재되어 있었고, 이 시기의 난소 조직의 전반적인 염색도는 저선량의 X-선 조사에서보다 더 현저히 강한 염색성으로 나타났다(Fig. 3-C).

## 고 찰

이온화 방사선에 피폭된 세포들은 핵 및 세포질에서 변화가 일어나고 생체의 생식세포가 이온화 방사선에 의해 소멸된다는 사실은 매우 잘 알려져 있다(Dobson & Felton, 1983; Erickson, 1985). 그리고 이온화 방사선에 대한 생체의 영향을 평가하는 방법으로 생식세포에 대한 생화학적, 형태학적 효과, 세포의 치사정도, 생식능력의 변화 및 유전적 영향 등이 연구되어 왔다(Lindop, 1969). Ronnback (1983)은 흰쥐에 방사선원인 strontium-90을 투여한 태자의 난소 내 세포수가 감소하는 것을 보고하였다. 또한, X-선,  $\gamma$ -선, 중성자선(neutrons) 및 양자선(photons) 등에 대한 미성숙 난자의 감수성 역시 매우 민감하다고 보고되었다(Erickson et al., 1976; Gregg et al., 1978).

그리고, iodine-125 혹은  $\beta$ -선원인 삼중수( $^3\text{H}_2\text{O}$ )를 흰쥐에 복강주사 혹은 구강으로 섭취시킨 후 조직학적으로 관찰했을 때 난소 내 난자의 수가 감소하는 경향을 보였고, 난자의 형태가 핵물질이 분산되고, 가성숙되며, 과립세포의 핵응축 현상이 일어난다는 보고들(Kapoor et al., 1985; Lavu et al., 1985; Satow et al., 1989)은 난포가 퇴화된다는 것을 의미한다. 그러나 방

사선 치료를 위해 임상에서 인체에 사용하는 X-선을 이용한 난포의 폐쇄와 퇴화과정에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서 정상 생쥐 생체에 200, 400, 600 cGy의 X-선을 조사한 후 3일이 경과된 조직을 일반조직염색과 특수조직 염색으로 관찰한 결과 난포의 위축은 신속하게 진행되었으며, 200 cGy 조사선량에서 이미 과립층세포는 세포사이 경계가 불규칙하게 나타났고, 조사선량이 증가 할수록 이들 세포는 핵의 응축과 핵의 분절화 현상이 뚜렷하게 나타났다. 핵이 응축되면서 괴사되어가는 세포에서는 세포질이 작아지는 것을 볼 수 있다. 이와 같은 현상은 수분과 전해질이 세포 밖으로 빠져나가기 때문인데, 세포내 골격이 수축되고 세포 내 압력이 상승함으로써 나타난다(Savill et al., 1990).

본 연구의 특수조직염색에서 난포의 근간을 이루는 기질의 세망섬유는 형태가 불규칙하고 흩어져 있는 상태로 관찰되었다. 이와 같은 현상은 세포의 다양한 변화와 함께 이들 조직을 받쳐주는 성분들의 변형이 일어나게 되며, 결국 저선량의 X-선에서 이미 조직은 치명적인 손상을 받아 난포의 구조적 변형이 일어남과 동시에 구성세포들의 괴사와 세포자연사가 일어났다는 것을 의미한다.

세포자연사는 여러 가지 생리적 자극에 의해 일어나는데, 사멸 과정중의 세포는 미토콘드리아와 원형질막이 유지되지만 어느 정도 진행되면 blebbing 또는 bubbling이라 불리는 특징적인 소견이 나타나게 되고, 이 시기에 원형질막의 전해질 이동은 유지된다(Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980; Kerr et al., 1987).

조직학적 관점에서 세포자연사에 대하여 충분히 인식되지 못했던 점은 자연사하는 세포의 크기가 작아서 광학현미경으로 관찰되지 않았으며, 주위의 세포가 사멸된 세포를 신속하게 탐식하고, 주위조직에 염증반응을 일으키지 않으며, 세포의 괴사현상과의 구별이 쉽지 않았기 때문이다(Kerr et al., 1972).

세포자연사는 세포 내 genomic DNA가 endonuclease에 의하여 처음에는 700, 300 및 50 kb크기의 high molecular weight DNA로 잘려지고, 이어서 nucleosome 크기(약 185 bp)의 oligomer로 잘려지게 된다. 이러한 DNA분절화는  $\text{Ca}^{2+}$ 와  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent endo-

nuclease에 의해 일어난다(Cohen & Duke, 1984; Kyprianou & Issac, 1988). 이 효소는 특이적으로 DNA를 핵산 단위로 절단함으로써 DNA는 185~200 bp 크기의 다중체로 절편을 형성하게 된다. 이것을 agarose gel 전기영동 후에 ethidium bromide로 염색하여 관찰하면 DNA band가 뚜렷이 사다리 모양을 나타내는 것을 확인할 수 있어서, 세포자연사를 평가하는데 이 DNA 분절화 분석 방법이 널리 이용되고 있다(Wyllie, 1980).

또한, 이러한 DNA분절화는 apoptotic body와 핵의 응축과 같은 세포 죽음의 형태학적 특성에 선행하여 나타나는 현상으로 인식되고 있고, 결국은 염색질과 세포질내 소기관이 응축되어 막에 둘러싸인 세포자연사 소체를 형성한 다음, 주위세포에 의하여 신속하게 제거된다(Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980). 이 과정에서 원형질막은 파괴되지 않으므로 세포 내 물질이 세포 주위에 유출되지 않아 염증반응을 일으키지 않는다.

본 연구에서 정상조직의 퇴화난포와 X-선 조사를 받은 난소의 생식세포의 DNA 분절화를 확인하기 위해서 TUNEL 염색을 실시한 결과 정상난소의 퇴화난포에서 양성반응을 나타내었고 X-선 조사군에서도 강한 양성반응을 나타내었다. 본 연구에서 과립층세포는 X-선 조사선량이 200, 400, 600 cGy로 증가됨에 따라 점점 강하게 염색이 되었으며, 성장난포 내에서 양성반응을 보이는 세포의 범위도 현저하게 늘어나는 것을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과는 과립층세포가 난포 폐쇄의 주요 원인이며 세포자연사에 의해서 퇴화된다는 것을 의미한다. 과립층세포에서 강한 양성반응을 보이는 기작은 분절화된 DNA의 3와 5 prime 양쪽 끝에 digoxigenin-ddUTP를 연결시키기 위해 terminal transferase 효소와 결합되어 있는 항체 anti-digoxigenin-peroxidase와 반응하여 발색되어 나타나게 된다(Billig et al., 1993). 또한, 본 연구의 600 cGy 조사선량에서 난포세포도 이미 세포예정사가 진행되어 양성반응으로 나타났으며, 난포 주변 기질의 결합조직세포 핵들도 갈색으로 염색되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Richardson WD, Raff MC: Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70 : 31-46, 1992.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW: Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133 : 2204-2212, 1993.
- Bowman PD: CRC hand book of cell biology of aging., Cristofalo VJ, Adelman RC and Roth GS (eds.), CRC Press, Florida, pp. 117, 1986.
- Cohen JJ, Duke RC: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132 : 38-42, 1984.
- Collins MKL, Lopez-Rivas A: The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 18 : 307-311, 1993.
- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR: Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* 52 : 997-1005, 1992.
- Dobson RL, Felton JS: Female germ cell loss from radiation and chemical exposures. *Am J Indust Med* 4 : 175-190, 1983.
- Emerit J, Chaudiere J: CRC hand book of free radical and antioxidants in biomedicine, Miquel J, Quintailha AT and Weber H (eds.) vol. 1, CRC Press, Florida, pp. 177, 1989.
- Erickson BH, Reynolds RA, Murphree RL: Late effect of <sup>60</sup>Co gamma radiation on the bovine oocyte as reflected by oocyte survival, follicular development, and reproductive performance. *Radiat Res* 68 : 132-137, 1976.
- Erickson BH: Effects of ionizing radiation and chemical on mammalian reproduction. *Vet Hum Toxicol* 27 : 409-416, 1985.
- Fridovich I: Superoxide dismutase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, (ed. Bergmyer), Academic Verlag Berlin 58 : 61-97, 1986.
- Gregg RL, Humphrey HD, Thames JR, Meyn RE: The response of chinese hamster ovary cells to fast neutron radiotherapy beams III. Variation in relative biological effectiveness with position in the cell cycle. *Radiat Res* 76 : 283-291, 1978.
- Hassell JR, Dratt RM: Elevated levels of cAMP alters the effect of epidermal growth factor in vitro on programmed cell death in the secondary palatal epithelium. *Exp Cell Res* 106 : 55-62, 1977.
- Kapoor G, Sharan RN, Srivastava PN: Histopathologic chang-

- es in the ovary following acute and chronic low-level tritium exposure to mice in vivo. *Int J Radiat Biol* 47 : 197-203, 1985.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239-257, 1972.
- Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ: Apoptosis. In: perspectives on mammalian cell death (ed. Potten CS), Oxford University Press, England, pp. 35, 1987.
- Kim JK, Lee CJ: Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in  $\gamma$ -irradiated mouse. *Mutation Res* 449 : 33-39, 2000.
- Koury MJ, Bondmant MC: Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells. *Science* 248 : 378-380, 1990.
- Kyprianou N, Issac JT: Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122 : 552-562, 1988.
- Lavu A, Reddy PP, Reddi OS: Iodine-125 induced micronuclei and sperm head abnormalities in mice. *Int J Radiat Biol* 47 : 249-253, 1985.
- Lin JK, Chou CK: In vivo apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 52 : 385-388, 1992.
- Lindop PJ: The effects of radiation on rodent and human ovaries. *Proc Soc Med* 62 : 144-148, 1969.
- Nagata S: Apoptosis-Mediating as antigen and its natural mutation. *Cell Mol Biol* 8 : 313-326, 1994.
- Ozkan L, Ozuysal S, Egeli U, Adim SB: Effect of taxol plus radiation on the apoptotic and mitotic inducés of mouse intestinal crypt cell. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 : 433-438, 2001.
- Ronnback C: Effects on fetal ovaries after protracted, external gamma irradiation as compared with those internal deposition. *Acta Radiol Oncology* 22 : 465-471, 1983.
- Satow YH, Hori JY, Lee M, Ohtaki S, Nakamura SN, Okada S: Effect of treated water on female germ cells: Mouse oocyte killing and RBE. *Int J Radiat Biol* 56 : 293-299, 1989.
- Savill H, Dransfield I, Hogg N, Haslett C: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343 : 170-173, 1990.
- Schwalm RH, Robbins K, Jardieu P, Chung L, Lai C, Terrel TG: Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology* 18 : 347-356, 1993.
- Singh A, Singh H: Time-scale and nature of radiation-biological damage : approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Prog Biophy Mol Biol* 39 : 69-107, 1982.
- Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 : 255-256, 1980.
- Zyuzikov NA, Prise KM, Zdzienicka MZ: The relationship between the relative biological effectiveness of alpha particles and the radiosensitivity of different mutations Chinese hamster cells. *Radiat Environ Biophysics* 40 : 243-248, 2001.

#### < 국문 초록 >

본 연구는 6 MeV LINAC에서 발생한 X-선을 생쥐 생체에 조사한 후 난소에서 난포의 형태적 변화 양상과 난포의 세포자연사가 일어나는 과정을 TUNEL 염색방법을 이용하여 광학현미경으로 관찰하였다. 정상난포와 퇴화난포 및 방사선이 조사된 난포에서 세포예정사가 발생하는 것을 확인하기 위해서 TUNEL 염색을 실시한 결과, 정상난소의 퇴화난포에서 양성반응을 보이는 과립층세포들은 갈색을 띠고 있었고, 핵은 응축되어 나타났다. 그러나, 정상난포에서는 양성반응이 나타나지 않았다. X-선을 조사한 난소의 난포는 TUNEL 염색에 강한 양성반응이 나타났고, 600 cGy의 X-선 조사에서 난포세포는 이미 세포예정사가 진행되어 파괴되었음을 확인할 수 있었다. 그리고 난포막을 형성하고 있는 난막세포의 핵들도 양성반응으로 나타나, 갈색으로 염색이 되었으며, 수질의 결합조직세포들의 핵도 갈색으로 염색되어 관찰되었다. 또한, 대부분의 세포들은 세포예정사가 진행되어 있으며, apoptotic body들이 난포 내에 산재되어 있었다. 이 시기의 난소조직의 전반적인 염색도는 저선량의 X-선 조사에서보다 더 현저히 강한 염색성이 나타났다.