

인체 임파구세포에서 X-선 조사에 의한 세포사의 형태에 주정성분이 미치는 영향

손 중 기

부산대학교병원 방사선종양학과

2009년 11월 2일 접수 / 2010년 3월 3일 1차수정 / 2010년 4월 18일 2차수정 / 2010년 4월 19일 채택

방사선의 노출로 유발되는 장해위험을 극복하기 위한 방사선 방호제의 개발은 중요한 과제가 되고 있다. 또한 급속히 발전하고 있는 방사선 치료 분야에도 치료에 수반되는 부작용을 경감하는 약제의 활용은 효과적인 치료가 가능해진다. 그러나 항 방사선 방어제로 실용화 되어 있는 약제는 매우 적은 실정이다. 따라서 주류 속에 함유된 미량성분으로부터 세포를 보호하는 방사선 방호제로서 활용 가능성을 알아보기 위해 맥주와 그 미량 성분들을 대상으로 실험한 바 있고, 그 주류의 한 종류로서 시판되고 있는 소주의 주정성분에 대하여 세포사의 형태와 그 발현 빈도를 유세포분석기를 이용하여 분석하고자 하였다. 건강한 성인자원자 5명으로부터 동의를 얻어서 증류수와 맥주 그리고 소주에 각각 알코올 $81.5\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ 의 동일농도로 섭취하게 한 후에 2시간 경과 후 채혈하였고, 이로부터 임파구 세포를 분리하여 방사선을 0.5 Gy에서 5 Gy까지 조사한 다음 60시간 배양한 후에 유세포 분석기로 분석하였다. 전체 세포에 대한 세포 생존비율의 경우 방사선량이 증가할수록 세포 생존율은 점진적으로 감소하였다. 전세포고사의 비율은 소주 섭취군에서는 약 20%정도 대조군에 비해 감소된 것으로서 나타났다. 세포괴사의 비율은 소주 섭취군에서 선량이 증가할수록 약35%정도의 기울기로 증가하였다. 초기 세포고사비율은 맥주 섭취군이 대조군에 비해 약20% 발현율이 높게 나타났으나 소주 섭취군의 경우, 전 선량 영역에서 약25%로 그 발현율이 저하되었다. 지연 세포고사 비율은 소주 섭취군에서는 대조군에 비하여 약20-30% 증가를 보였다. 특히 선량이 1.0 Gy에서 5.0 Gy사이의 영역에서 높은 발현율을 보였다. 방사선 방호제의 유용성 여부는 세포 보호효과가 얼마나 있느냐에 따라 달려있다. 맥주 섭취군의 대조군에 비해 약20% 발현율이 높게 나타났으나, 소주 주정성분의 경우 전체 세포 고사유발에서는 약20%의 감소와 초기 세포고사비율이 현저하게 낮은 것으로 미루어 보아 세포보호 효과는 미약하게 있으나 지연 세포고사의 높은 발현율은 세포괴사 비율을 증가시켰다. 이러한 경우는 다른 세포사의 형태인 세포증식사가 더욱 중요하게 작용한 것으로 알 수 있다. 따라서 소주 주정성분의 경우는 방사선 방호물질로 효용성이 적은 것으로 사료된다.

중심어 : 세포괴사, 세포고사, 방사선방호제, 유세포측정기

1. 서론

방사선은 여러 분야에서 사용이 증가하고 있으며, 이용에 따른 방사선 종사자들의 피폭에 의한 장해의 리스크를 극복 할 수 있는 방사선 피폭방어제의 개발을 위한 연구는 사회적 중요한 과제가 되고 있다. 특히 1998년 일본에서 발생한 도카이무라 우라늄 가공공장의 임계사고 이후 원자력 관련 업무종사자의 리스크를 경감시키는 약제의 개발은 큰 주목을 받고 있다[1].

또, 최근에는 급속히 발전하고 있는 방사선 치료 부분

에도 치료에 수반되는 부작용을 경감하는 약제를 활용함으로써 한층 더 효과적인 치료가 가능해지고 있으나 방사선피폭에 의한 인체의 장해 또는 부작용의 예방이나 치료를 목적으로 하는 항 방사선 피폭 방어제로 실용화되고 있는 약제는 극히 적은 것이 현실이다.

세포사(cell death)의 일종인 세포고사는 세포의 형질변화를 막기 위한 체내의 방어기전으로 이해할 수 있는데, 방사선에 의해 유발된 세포고사를 저감시킬 수 있는 방사선방호제의 개발은 그 중요성이 매우 높다 하겠다.

따라서 주류 속에 함유된 미량성분들의 방사선 방호제로 활용가능성을 알아보기 위한 실험으로 맥주(Beer)와 그 미량성분에 대하여 선행 연구를 진행한바[2] 있고 그

책임저자 : 손중기, bigshon@hanmail.net, 부산대학교병원 방사선종양학과

주류의 한 종류로서 시판되고 있는 소주(Soju)의 추정성분으로부터 세포사(Apoptotic cell, Necrotic cell)의 형태를 알아보기 위해 각각의 추정성분에 따른 세포사의 발현 정도와 그리고 세포의 생존율을 Flow cytometry를 이용하여 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 체혈

전혈의 말초혈액은 건강한 정상인 자원자 5명(26~38세)의 동의를 얻어 확보하였다. 대조군은 증류수(distilled water)를 섭취하였으며, 실험군은 소주 4.5잔(알콜 농도 81.5 mg·dl⁻¹)과 맥주 800 ml(알콜농도 81.5 mg·dl⁻¹)를 각각 섭취하고 2시간 경과 후 자원자로부터 각각 8 ml의 혈액을 정맥천자를 통하여 EDTA 튜브에 분주하였다.

2. 말초혈액의 임파구세포 분리

전 혈액에서 말초혈액 임파구세포의 분리는 기존의 밀도구배원심분리 방법을 이용하여 분리 하였고, 상온에서 600 g의 속도로 30분간 원심 분리하여 상층의 혈청을 약간만 남기고 제거한 후, 남아있는 세포들을 PBS로 1:1로 희석하였다. 15 ml 용량의 튜브를 준비하고 5 ml의 Histo paque-1077(Sigma)를 채운 후, 희석된 혈액을 조심스럽게 상층에 올려놓은 다음, 튜브를 상온에서 400 g의 속도로 30분간 원심 분리하였고, 감속 시에는 브레이크를 사용하지 않은 채 감속하였다. 세포가 모여 있는 사이층을 피펫을 이용하여 조심스럽게 분리하고, 분리한 사이층은 각 5 ml의 PNB inter phase를 이용하여 3회 세척하였다.

3. 방사선조사

방사선조사는 임상에서 암 치료에 이용되고 있는 선형가속기인 Clinac 21Ex (Varian,USA)으로 6 MV(X-선), 분당 3 Gy의 선량률로 분주된 혈액에 SSD(시료 거리) 100 cm에서 조사하였다.

4. 말초혈액 임파구세포배양

말초혈액 임파구세포는 100 units/ml의 Penicillin-Streptomycin과 15% FBS가 함유된 RPMI-1640(Gibco) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 말초혈액 임파구세포를 배지 1 ml당 2x10⁵개의 밀도를 6-Well cell culture plate에 분주하였으며 실험조건에 맞추어 각각 방사선 선량이 다르게 조사한 말초혈액 임파구세포를 60시간 동안 배양하였다.

5. 유세포분석(Flow cytometry)

유세포분석기(Becton Dickinson, USA)를 이용한 세포 분석을 위하여 Annexin-V-FITC(Pharmingen)와 Propidium iodide(PI, 5 µg·ml⁻¹, Sigma)로 세포들을 염색 처리하였고, Cell quest software(Becton Dickinson; BD)를 이용하여 FACS Caliber(BD)에서 520 nm와 630 nm 영역에서 FITC 혹은 PI 형광을 보이는 세포들을 분석하였다.

Annexin-V-FITC 는 칼슘의 존재하에 포스파티딜세린과 결합하는 형광표지물이다. 이중 형광염색에서 세포고사에 있는 세포는 Annexin-V-FITC(Pharmingen) 에만 염색되고 살아있는 세포는 어느 것에도 염색되지 않으며, Necrosis(괴사) 된 세포는 Propidiumiodide (PI)에 염색된다. 따라서 생존한 전체세포에 대해 1-4분획세포로 구분하여 측정하였다. 즉, 각 세포군에서 관찰된 고사세포 비율은 100×(고사세포/전체세포)로 괴사세포비율은 100×(괴사세포/전체세포)로 부터 세포고사율, 세포괴사율, 세포생존율, 조기와 후기세포 고사율을 각각 분석하였다.

6. 자료처리와 통계분석

세포사(apoptotic cell, necrotic cell)분석을 위하여 Staistical Package for the Social Sciences(SPSS) Version 10.0을 이용하였으며 실험결과는 평균 ± 표준오차형태로 나타내며 그룹간의 통계적 유의성분석은 SPSS WIN ver,12를 이용하여 일변량 분석과 사후검정방법을 이용하여 P Value <0.05를 기준으로 통계적 유의성을 검증하였다.

실험결과

1. 전체 세포에 대한 세포생존비율

방사선조사 후 60 시간에 세포생존율을 측정하였으며, 방사선 선량에 따른 생존율은 방사선조사를 받지 않은 군(0.0 Gy)에 대한 상대적인 비(평균±표준오차)로 나타내었다.

선량이 0.5 Gy, 1.0 Gy, 2.0 Gy, 3.0 Gy, 5.0 Gy일때, 대조군에서 세포생존율은0.8±0.0, 0.7±0.1, 0.6±0.1, 0.6±0.1, 0.4±0.1로 감소하였으며, 맥주섭취군에서는 각각 0.7±0.1, 0.6±0.0, 0.5±0.1, 0.4±0.1, 0.3±0.1이었으며, 소주섭취군에서는 각각 0.9±0.0, 0.7±0.1, 0.5±0.1, 0.5±0.1, 0.4±0.1로 선량이 증가함에 따라서 전반적으로 생존율은 감소하였으며, 맥주섭취군에서 대조군에 비해 약 15%의 생존율이 감소하는 것으로 나타났다(Table 1.2.3, Fig 1.).

Table 1. Relative Ratio of Cell Populations in Irradiated Human Lymphocytes of Control Group.

population	0 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy	2.0 Gy	3.0 Gy	5.0 Gy
necrotic cell	1.0	2.6	3.1	3.7	4.3	5.2
apoptotic cell	1.0	1.2	1.4	1.5	1.5	1.5
viable cell	1.0	0.8	0.7	0.6	0.6	0.4
early apoptosis cell	1.0	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8
late apoptosis cell	1.0	1.8	2.5	3.0	3.1	3.3

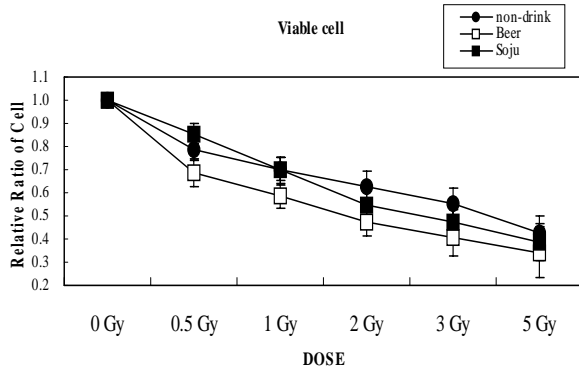


Fig 1. Cell viability of irradiated human lymphocytes in control, beer, and Soju group.

2. 전체세포에 대한 세포괴사비율

대조군에서는 0.5 Gy, 1.0 Gy, 2.0 Gy, 3.0 Gy, 5.0 Gy의 선량에 따라 1.2±0.1, 1.4±0.1, 1.5±0.2, 1.5±0.2, 1.5±0.1로 나타났고, 맥주섭취군에서는 각각 1.2±0.1, 1.3±0.1, 1.4±0.1, 1.5±0.1, 1.5±0.1, 이었으며, 소주섭취군에서는 0.9±0.1, 0.9±0.0, 1.0±0.1, 1.0±0.1, 1.1±0.1로 소주섭취군에서는 대조군에 비하여 약 20%의 세포괴사 발현율이 낮게 나타났다(Table 1.2.3, Fig 2.).

Table 2. Relative Ratio of Cell Populations in Irradiated Human Lymphocytes of Beer Group

population	0 Gy	0.5 Gy	1.0 Gy	2.0 Gy	3.0 Gy	5.0 Gy
Necrotic cell	1.0	3.3	3.9	4.7	5.0	5.6
Apoptotic cell	1.0	1.2	1.3	1.4	1.5	1.5
Viable cell	1.0	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3
Early apoptotic cell	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8
Late apoptotic cell	1.0	2.3	2.6	3.2	3.9	4.0

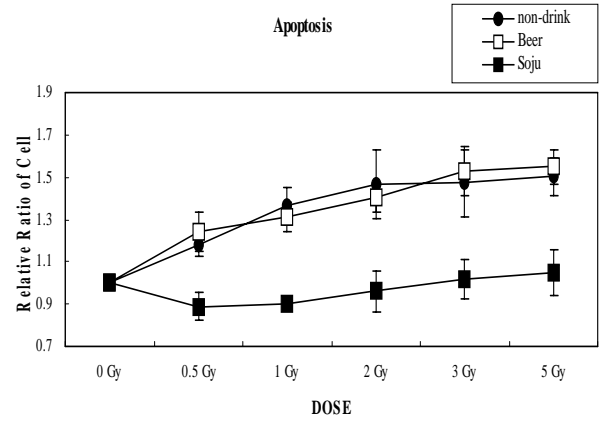


Fig 2. Apoptotic cells of irradiated human lymphocytes in control, beer, and Soju group.

3. 전체 세포에 대한 세포괴사비율

대조군에서 세포괴사의 비율은 0.5 Gy, 1.0 Gy, 2.0 Gy, 3.0 Gy, 5.0 Gy로 선량이 증가함에 따라서 2.6±0.6, 3.1±0.7, 3.7±0.9, 4.3±1.1, 5.2±1.3으로 완만하게 증가하였고, 맥주섭취군에서는 3.3±0.8, 3.9±0.4, 4.7±0.6, 5.0±0.8, 5.6±1.4,로 나타났으며, 소주섭취군에서는 각각 3.0±0.5, 4.9±0.9, 6.7±1.5, 7.5±1.1, 8.5±1.6으로 선량이 증가할수록 대조군에 비해 기울기 약 35% 증가하였다(Table 1.2.3, Fig 3.).

Table 3. Relative Ratio of Cell Populations in Irradiated Human Lymphocytes of Soju Group

population	0Gy	0.5Gy	1.0Gy	2.0Gy	3.0Gy	5.0Gy
Necrosis	1.0	3.0	4.9	6.7	7.5	8.5
Apoptotic cell	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.1
Viable cell	1.0	0.9	0.7	0.5	0.5	0.4
Early apoptotic cell	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Late apoptotic cell	1.0	2.6	3.2	3.9	4.5	4.9

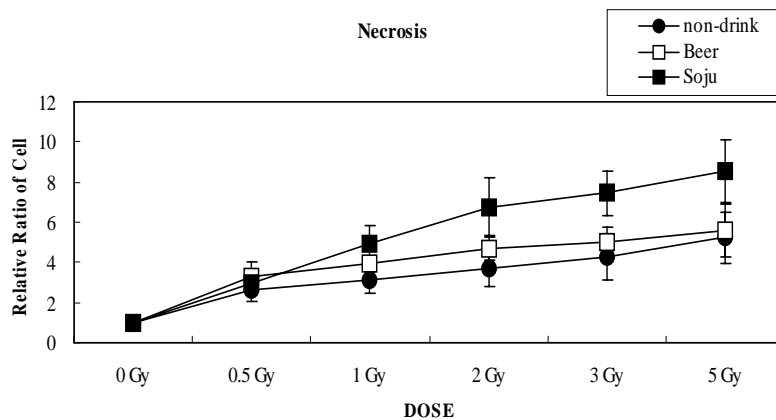


Fig 3. Necrotic cells of irradiated human lymphocytes in control, beer, and Soju group.

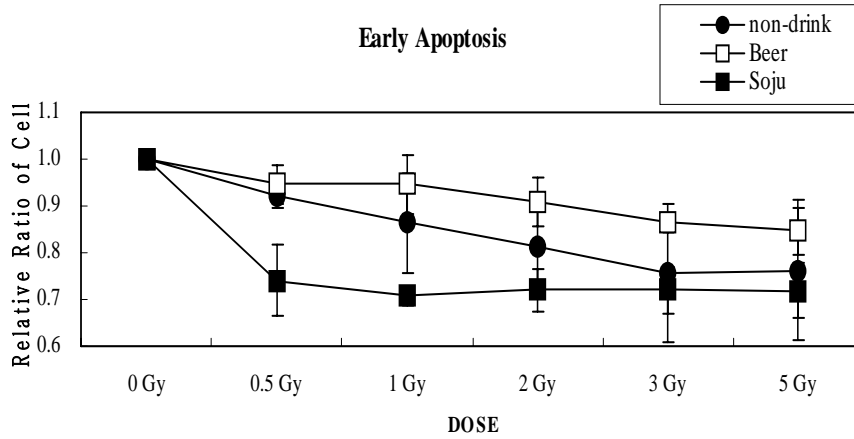


Fig 4. Early apoptotic cells of irradiated human lymphocytes in control, beer, and Soju group.

4. 전체 세포에 대한 조기 세포고사비율

전체 세포고사비율에서는 소주섭취군의 경우에 매우 낮은 세포고사율을 보였다. 이 세포고사비율은 조기세포고사와 지연세포고사를 합한 고사율을 나타냈다. 그러나 이들을 각각 분리하여 측정한 결과 다음과 같이 분석되었다.

대조군의 경우 0.5 Gy, 1.0 Gy, 2.0 Gy, 3.0 Gy, 5.0 Gy의 선량에서 0.9 ± 0.0 , 0.9 ± 0.1 , 0.8 ± 0.1 , 0.8 ± 0.1 , 0.8 ± 0.2 이었고 맥주섭취군에서는 0.9 ± 0.0 , 0.9 ± 0.1 , 0.9 ± 0.1 , 0.9 ± 0.2 , 0.8 ± 0.0 으로 대조군에 비해 약 23%의 발현율이 높았다. 그러나 소주섭취군에서는 0.7 ± 0.1 , 0.7 ± 0.0 , 0.7 ± 0.1 , 0.7 ± 0.1 로 대조군에 비해 전체 선량영역에서 조기세포고사는 약 25% 정도 낮게 측정

되었다(Table 1.2.3, Fig 4.).

5. 전체 세포에 대한 지연 세포고사비율

대조군에서 지연 세포고사비율은 선량이 0.5 Gy, 1.0 Gy, 2.0 Gy, 3.0 Gy, 5.0 Gy로 증가함에 따라서 1.8 ± 0.2 , 2.5 ± 0.3 , 3.0 ± 0.6 , 3.1 ± 0.3 , 3.3 ± 0.4 으로 완만한 증가를 보였으며, 맥주섭취군에서는 2.3 ± 0.5 , 2.6 ± 0.3 , 3.2 ± 0.6 , 3.9 ± 0.9 , 4.0 ± 0.7 로 대조군에 비해 약간 증가하였으나, 소주섭취군에서는 2.6 ± 0.4 , 3.2 ± 0.8 , 3.9 ± 1.4 , 4.5 ± 1.3 , 4.9 ± 1.4 으로 매우 높게 나타났다. 즉, 대조군에 비해서 1 Gy에서 5 Gy영역에서 약 25-30%의 발현율의 증가를 보였다(Table 1.2.3, Fig 5.).

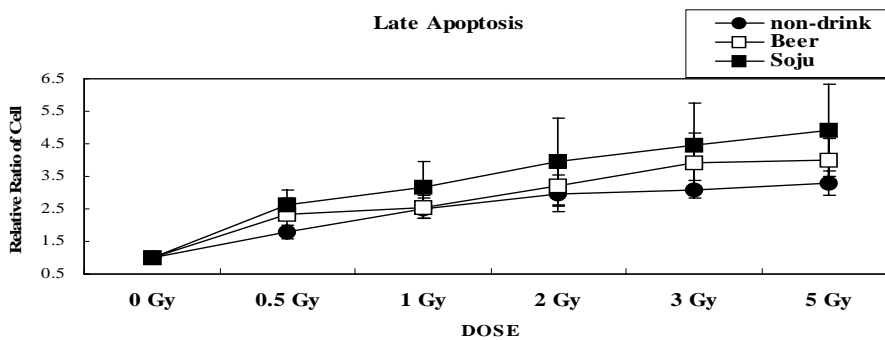


Fig 5. Late apoptotic cells of irradiated human lymphocytes in control, beer, and Soju group.

고찰

인체에 방사선이 조사되었을 때 세포내에서 조직과 반응하여 다량의 세포내 전자를 발생하며 이로 인해 세포내 과산화 유리기가 생성되어 핵산(DNA)에 손상을 일으킨다[3]. 핵산의 손상에 있어 중요한 변화로는 DNA기본손상, DNA-DNA 또는 DNA-단백고교와 DNA phosphodiester backbone의 분리에 의한, 외가닥 절단(single strand break) 또는 양가닥 절단(double strand breaks)이 일어

난다.

그중에서 양가닥 절단이 방사선 의한 세포사망에 가장 결정적이고 중요한 손상으로 알려져 있다[4,5]. 또한 과량의 항암제나 독성물질, 고선량의 방사선에 노출되면 DNA 손상뿐만 아니라 세포질내의 단백질과 효소, 그리고 세포막, 인지질 등의 기능에도 영향을 미치게 되는데, 세포의 형질변화를 막기 위한 방어기전인 세포고사가 발현되며 또한 짧은 시간내에 세포괴사로 야기될 수 있다 [6,12].

이 과정에서 생성된 자유유리기는 세포막 구조물의 지방을 과산화시켜 세포막에 손상을 준다[9]. 그러나 산소의 농도가 낮거나 방사선방어물질(radio protector)이 있으면 자유유리기의 청소역활로 그 효과가 감소한다[7-9]. 세포사에는 세포괴사와 세포고사형태 그리고 세포사가 일어나는 시간에 따라서 중간기사(interphase death)와 증식사(mitotic death)로 분류 한다[8].

세포고사는 예정된 계획에 의하여 조절되어지는 세포사의 한 형태로 이는 많은 성장조직에서 생리적으로 발생하거나, 방사선, 자외선, 독성 등의 외적인 자극에 의해 발생하기도 하며, 필요하지 않거나 아치사손상을 받은 세포를 제거하는 정상적인 생리적 세포사를 의미한다[5,10].

세포괴사의 경우 세포손상으로, 세포 ATP의 고갈, 세포의 대사붕괴, 세포팽창과 용해 및 세포막의 파열이 일어나 세포 외부로 세포 구성 물질을 방출하여 주변 조직에 비 특이적인 염증반응을 일으킨다.

반면에 세포고사는 DNA 파괴후에도 세포막의 소실이 없으며, 세포핵의 파열, 염색체의 응결(inter nucleosomal fragmentation), 세포질의 응축(cell shrinkage), 세포고사체(apoptotic body)형성 등의 특징적인 양상으로 세포괴사와는 형태학적으로 구별된다[11]. 그리고 세포고사와 세포괴사는 같은 조직에서 동시에 발생할 수 있다. 한편 증식사는 핵산의 손상과 염색체 손상에 의해 일어난다.

본 연구에서는 세포고사와 세포괴사를 관찰하는 방법으로 유세포계측기를 사용하였다. 유세포계측기를 이용한 분석법은 세포사를 정량화할 수 있는 간편한 방법이며 최근에 사용이 증가하고 있다[12].

이는 세포고사를 탐식하는 대식세포가 고사세포를 알아내는 기전으로 세포막의 변화, 즉, 세포막의 이중 지질 구조 중 안쪽에 위치하는 인지질(phosphatidylserine)이 세포밖으로 뒤집어져 나오는 것을 인식하는 것을 이용하여 세포고사를 정량적으로 진단할 수 있는 방법으로 Phosphatidylserine에 annexin-V가 결합하는 것을 이용하여 Annexin-V에 형광물질인 FITC를 붙인 것이다. 이와 함께 세포핵에 결합하는 Propidiumiodide(PI)를 동시에 사용하면 세포막의 변화와 세포핵의 손상을 함께 정량적으로 측정할 수 있어 세포고사, 세포괴사 그리고 생존세포를 분획으로 구분하여 분석할 수 있다[13,14].

사람의 임파구를 in vitro 에서 방사선조사한 후 염색체 절단이 일어나는 시기가 6시간에서 72시간 사이이며, 이는 세포 배양 상태에 따라 영향을 받을 수 있다고 한다 [14]. 방사선감수성이 높은 임파구세포에서의 세포고사는 중간기사가 대부분이고 증식사도 관계가 있다는 보고가 있다.

손상을 받은 세포의 종류에 따라 세포고사가 발생할 수도 있고 세포분열정지가 발생하기도 하는데, 임파구세포는 세포고사와 세포분열정지가 일어난다고 한다[15]. 따라서 세포고사가 방사선조사 직후에 나타날 수도 있고, 또 핵산의 손상에 의해 세포의 분열이 일시적으로 정지한(세포주기정지) 후에 나타날 수도 있으며, 한번 이상의 세포분열이 이루어진 후에 나타날 수도 있다[16].

그리고 같은 세포에서도 손상을 가하는 물질에 따라서

다른 반응을 나타낸다. 세포분열정지는 유사분열을 하는 모든 세포에서 관찰되며, 높은 조사량뿐만 아니라 세포에 따라서는 1 Gy 이하의 낮은 조사량에서도 관찰된다[17].

세포분열정지 기간은 세포의 손상이 회복되지 않은 정도와 관계가 있으며 이러한 세포분열정지는 방사선감수성과 관계가 있다. 세포의 방사선감수성 차이는 세포의 종류, 분화정도, 증식율과 조절기전에 따라 다르게 나타난다[16,17].

일반적으로 흉선세포, 임파구, 장세포 같은 방사선에 민감한 세포는 방사선조사 직후 세포분열 없이 빠르게 세포고사가 발생하지만 이를 시간대별로 나누어보면 조기에 일어난 고사와 지연되어 나타나는 고사로 구별할 수 있다. 조기에 일어나는 고사는 주로 24시간 내에 발생하며, 지연해서 일어나는 고사는 세포가 받은 손상의 정도와 세포배양시간에 따라 달라질 수 있다. 즉, 중간기사가 대부분이고 증식사도 지연 세포고사 유발에 연관이 있다[18-20].

조기세포고사는 DNA의 양가닥절단에 의해서 유발되고 지연된 고사는 염색체 변이에 의해서 촉진되는 것으로 알려져 있고, 조기고사는 p53와 같은 유전물질의 존재에 따라 좌우된다고 하였다[20].

본 실험에서는 추정성분이 다른 종류의 주류(소주)를 섭취하게 하고 채취한 혈액에 방사선을 선량별로 조사시킨 후에 이를 60시간동안 동일하게 배양한 다음 유세포 분석기로 관찰하였다. 조기에 일어난 세포고사비율은 대조군에서 7.9% 범위였고 맥주섭취군에서는 7.8% 정도로 대조군과 거의 유사한 발현률을 보였다. 그러나 소주섭취군에서는 9-11%로 조기에 일어난 세포고사 발현비율이 증가하였다.

이렇게 조기에 일어난 세포고사가 감소한 이유로는 소주에 들어있는 곡물발효액(주정)과 첨가물이 체내섭취 후에 탄올이 산화하는 과정에서 생성하는 아세트알데히드 등의 독성물질에 의하여 DNA와 염색체에 가중된 손상으로 인하여 조기고사세포의 발현율을 감소시킨 것으로 추측할 수 있다. 그리고 소주섭취군에서는 선량증가에 따른 조기에 일어난 세포고사의 뚜렷한 변화는 없는 것으로 보아 추정성분이 다른 경우에도 세포사의 형태는 세포고사와 세포괴사가 거의 동시에 일어남을 알 수 있었다.

또한 동일한 선량에서도 추정성분과 세포내 환경에 따라서 세포고사가 빠르게 유발될 수 있으며(맥주섭취군) 또 발현이 느리게 일어나는 경우(소주섭취군)도 있다, 그리고 일정시간이 경과된 후(60시간배양)에는 조사선량에 무관하게 세포괴사가 우세한 경향을 보이는 것으로 보아 이 두 세포사의 형태가 한 실험 과정 내에서 공존함을 알 수 있었다.

자연세포고사(2분획)는 정상대조군에서 4-8% 범위에 맥주 섭취군에서는 3-5%, 소주섭취군에서는 7-13%로 대조군과 맥주섭취군은 비슷한데 비하여 소주섭취군에서 자연세포고사 발현비율이 매우 높음을 알 수 있었다. 소주섭취군에서 자연세포고사의 발현율이 높은 것은 DNA의 손상의 축적작용과 유전물질의 작용으로 인해 세포주기정지와 중간기사, 증식사 때문으로 생각할 수 있겠다.

즉 일차적 손상뿐 아니라 세포주기가 정지한 동안에 이차적 변화의 축적에 의해서도 일어나며, 또 지연반응은 손상의 크기에 따라 그 정지기간이 달라지므로 세포내 주변 환경의 영향이 더 크게 작용한 것으로 발현비율이 높은 이유를 설명할 수 있겠다.

따라서 본 연구에서도 세포분열정지는 소주속의 추정 성분인 알콜에 의해 세포내 환경의 영향 의해 발현된 것으로 생각된다. 그리고 세포분열정지의 경우 일정기간의 회복시간이 지난후에는 세포고사과정으로 이행하는 것이 일반적인 현상이나 손상의 정도가 수복의 한계를 초과한 상황에서는 세포사의 주경로가 세포고사보다는 분열 세포사의 경로로 변화하는 것으로 생각된다.

또 세포분열정지 후에 DNA 손상을 제대로 회복하지 못한 채 유사분열이 중지되거나 몇 번의 유사분열 후 사망하는 분열세포사가 발생한 것으로 생각된다. 같은 세포라 하더라도 손상 유발 물질의 종류에 따라 세포분열정지의 작용기전이 다를 수 있고 세포주기 정지기간도 세포사의 방향을 변화시킬 수 있다.

Bernhard등[21]은 Caffeine이나 staurosporine으로 세포분열 정지기간을 감소시킴으로써 분열세포사가 주로 발생하는 HeLa 세포에서 세포사의 경로를 세포고사로 변화시켰다고 하였다.

세포괴사의 경우(1분획)에 대조군에서는 24-45%였고, 맥주섭취군에서는 20-50%, 소주섭취군에서는 25-50%로 소주섭취군이 세포괴사비율이 높은 것을 알 수 있다. 또 선량이 증가할수록 세포괴사 유발율이 증가하였다. 소주섭취군에서 높은 지연세포고사비율은 동일한 비율로 세포괴사비율이 증가된 것으로 보아 이는 소주에 들어있는 여러 물질과 방사선의 영향에 의하여 세포분열의 주기가 정지되어있는 상태에서 24시간의 휴지기간을 지난 뒤 정지기간이 풀리는 시점에서 활성산소나 세포막에 유독성 물질 등으로 세포 외부환경에 의해 야기되는 급성 세포손상을 유발로 세포고사의 경로 보다는 세포괴사의 경로로 이행한 것으로 생각된다. 이는 아마도 세포배양과 같은 In vitro 실험조건에서는 생체와는 달리 방사선에 의한 손상을 복구하는 기전이 불충분함으로 손상된 세포는 결국 괴사로 빠지게 되리라 추측되었다.

그러나 특이하게도 맥주의 경우는 함유되어 있는 여러 성분 중 맥아와 효모에 들어있는 푸딩체의 작용(자유 유리기제거기능, 지방과산화방지)에 의하여 세포고사가 일어난 비율을 저감시킴으로서(표2 참조) 동시에 세포괴사의 비율도 대조군과 비슷하게 저감한 것으로 생각된다. 방사선에 의하여 세포내 물분자로부터 유리기가 생성되면 이 유리기가 세포막의 지방을 과산화시켜 세포막에 손상을 준다. 세포막 손상은 과도한 칼슘 이온 및 전해질의 유입을 유발하게 되며 세포내 생화학적, 미세해부학적 변화를 일으켜 세포괴사를 유발하게 되는데 소주의 추정 성분은 맥주군과는 다르게 세포막의 손상을 가중시킨 것으로 생각된다.(PI의 섭취증가) 그리고 세포내 칼슘이온의 증가는 삼투압의 불균형을 유발하여 미토콘드리아의 외막을 파괴한다. 미토콘드리아의 외막이 파괴되는 경우는 활성산소 산물의 증가, 저에너지전자의 생성으로 인해 세

포가 쉽게 괴사한다.

일반적으로 방사선의 노출과 같은 자극에 의한 세포의 손상시에 손상된 세포의 운명은 세포괴사보다는 세포고사의 과정으로 갈리는 경향이 있으며, 따라서 소량의 자극에 의해서는 대부분의 경우 세포고사가 유발되고 세포가 처리할 수 없는 대량의 위해의 경우에만 세포괴사에 빠진다는 것으로 가정할 수 있다[21,22].

궁극적으로 분열세포사가 세포괴사로 갈 것인가 지연된, 세포고사로 갈 것인가 하는 문제에 대한 연구가 계속 이어져야 할 것으로 여겨진다.

이상과 같이 본 연구에서는 방사선의 선량 0.5 Gy에서 5 Gy정도의 비교적 낮은 선량에서 임파구세포의 손상에 대한 세포사의 발현정도와 형태를 분석하였는데, 소주의 추정 성분인 곡물발효액의 경우 1.0 Gy와 2.0 Gy에서 방사선의 직,간접적인 작용으로 세포고사보다는 세포괴사 비율이 높게 일어난 것을 확인할 수 있었다. 그러나 현재 까지도 방사선에 의한 세포고사와 괴사의 발생기전은 불명할 뿐만 아니라, 방사선에 의한 반응도 방사선조사방법과 선량, 실험동물의 종과 연령, 세포의 증식과 분화 정도, 세포의 생리적 조건 등에 따라 달라질 수 있기 때문에, 향후에는 이들 요인들을 면밀히 분석하여 실험조건을 객관화시킨 다음, 세포사에 대한 방사선의 영향을 구명하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

결론

인체 말초혈액 임파구세포로부터 주류(맥주, 소주)에 사용된 추정 성분에 따라서 방사선노출에 대한 세포의 보호효과의 여부를 확인하기 위하여 대조군과 맥주섭취군 그리고 소주섭취군으로 나누어 세포사의 발현정도와 그 형태를 유세포분석기를 이용하여 분석하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 방사선량이 증가함에 따라서 세포의 생존율은 점진적으로 감소하였다.
2. 소주의 추정 성분에서는 지연된 세포고사수가 증가하였으며, 세포괴사로 이행할 가능성이 높았다.
3. 소주의 추정 성분에서는 세포고사 발현비율 보다는 세포괴사 발현비율이 증가하였다.
4. 맥주의 추정 성분에서는 조기세포고사와 전체 세포고사율이 증가하였다.

방사선 방호제의 유용성여부는 세포에 대한 보호효과가 얼마나 있는냐에 달려있다. 맥주성분의 경우 방사선에 노출된 세포가 형질변화를 막기 위한 방어기전으로써 발현하는 조기세포고사가 약 20% 정도로써 임파구세포에 대한 방사선방어효과가 있는 것으로 분석되었으며, 그리고 세포괴사의 억제효과도 확인할 수 있었다. 그러나 동일한 조건의 소주 추정 성분은 전 선량영역에서 세포고사 유발저하를 가져왔으며, 특히 지연된 세포고사가 증가하였고, 또 세포괴사비율이 높은 것은 임파구세포에 대한 방사선 보호효과는 적은 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Lett JT. Damage to DNA and chromatin, Structure from ionizing radiations and the radiation sensitivities of mammalian cells. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 1990;39:305-352.
2. 손종기. 맥주의 방사선방어효과에 관한 연구. *대한방사선치료학회지* 2007;19(2):83-90.
3. Lavin MF, Schroeder AL. Damage-resistant DNA synthesis in eukaryotes. *Mutation Research/DNA Repair Reports* 1988;193(3):193-206.
4. Ward JF. Biochemistry of DNA lesions. *Radiation Research* 1985;104:103-111.
5. Kerr, JFR, wyllie AH, currie AR apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue Kinetice. *Br. J Cancer* 1972; 26:239-455.
6. Okada S. Radiation induced death. In: Altman KI, Gerber GB, Okada S, eds. *Radiation biochemistry Volume I: Cells*. New York; Academic Press, 1970:247-307.
7. 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. *International Journal of Radiation Biology* 1982;41(2):161-181.
8. Kerr JF, Gobe G.C, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods in cell biology* 1995;46:1-27.
9. Potten CS. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* 1997;269:518-521.
10. Shridi F, Robok J. The influence of calcium channel blockers on superoxide anions. *pharmacol. Res. commun.* 1988;20(1):13-21.
11. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis : Its signification cancer and therapy. *Cancer* 1994;73: 2013-2026.
12. Cregan SP, Boreham DR, Walker PR, Brown DL, Mitchel BEJ. Modification of radiation induced apoptosis in radiation or hyperthermia-adapted human l lymphocytes. *Biochemistry and Cell Biology* 1994;72: 475-482.
13. Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis : premitotic apoptosis and post mitotic apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2001;5(3):240-253.
14. Zamair L, Falcieri E, Zauli G, Catal A, Viatle M. Opimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry* 1993; 14(8):891-897.
15. Stein L, Wang JM. Detecting apoptotic cells by flow cytometry using annexin V. *Hot lines* 1997;3: 12-13.
16. Yarnold J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 1997; 44(1):1-7.
17. Packham G, Porter CW, Cleveland JL. C-Myc induces apoptosis and cell ycle progression by separable, yet overlapping, pathways. *Oncogene* 1996;13(3):461-469.
18. Halicka HD, Seiler K, FeidmanN EJ, Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis* 1997;2(1):25-39.
19. Barbert NC, Carr AM. Fission yeast wee protein Kinase is not required for DNA damage dependent mitotic arrest. *Nature* 1993;364:824-827.
20. Dewey WC, Ling CE, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis; Relevance to Radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics* 1995;33(4):781-796.
21. Shinomiya N, Kuno Y, Yamamoto F, Fukasawa M, Okumura A, Uefuji M, Rokutanda M. Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics* 2000;47(3):767-777.
22. Bernhard EJ, Muschel RJ. Bakanauskas LJ, Mckenna WG. Reducing the radiation-induced G2 delay causes HeLa cells to undergo apoptosis instead of mitotic death. *International Journal of Radiation Biology* 1996;69(5):575-584.

Effect of Trace Elements in Alcohol Beverages on the Type of Radiation-induced Cell Death.

Sohn Jong Gi

Department of Radiation Oncology, Busan National University Hospital

Abstract - Developments of radioprotective agents are important issues for minimizing the troubles and the effective treatments in radiotherapy. But few agents are useful in clinical and practical fields. It was shown that trace elements in alcohol beverages might have radioprotective effect. In this study, the types of cell death of lymphocytes according to the commercial alcohol beverage was investigated. Normal healthy volunteers ingested distilled water, beer or soju containing 8.15 mg·dl⁻¹ ethyl alcohol, respectively. After 2 hours, their blood were sampled with their consents. Fraction of lymphocytes was isolated by density gradient method with Histopaque-1077 (Sigma) and irradiated with dose from 0.5 to 5 Gy. After 60 hour incubation, the cells were harvested and analysed by flow cytometry. Cell viability was decreased by dose dependent manner. Cell viability of beer group was reduced about 15% compared with control group. Apoptosis in soju group was reduced about 20% compared with control group. Apoptosis of beer and control groups

are similar. Necrosis of soju group significantly increased about 35% compared with control group. Early apoptosis of beer group was increased compared with control group. Early apoptosis of soju group was decreased about 25% compared with control group. Late apoptosis of beer and control group was increased by dose dependent manner. Late apoptosis of soju group was increased about 20-30% compared with control group. Late apoptosis of soju was increased and the radioprotective effect of soju was minimal because late apoptosis induced the cell necrosis. In case of soju trace elements, total cell apoptosis was decreased about 20% and early cell apoptosis was remarkably low. In this case, mitotic cells death may be dominant mechanism. Therefore, trace elements in soju may not be effective radioprotective agents.

Keywords : Radioprotective agents, Necrosis, Apoptosis, Flow Cytometry.