

# Low LET X-ray가 췌장 $\beta$ 세포와 신경세포에 미치는 효과 - Effect on Pancreatic Beta Cells and Nerve Cells by Low LET X-ray -

경북대학교병원 · 대구보건대학교<sup>1)</sup>

박광훈 · 김구환<sup>1)</sup>

### — 국문초록 —

배양된 췌장베타세포와 신경세포를 10% FBS (fetal bovine serum), 11.1 mM glucose의 normal 조건과 1% FBS, 30 mM glucose의 hyperglycemia 조건으로 배양하고, 저 LET X-선을 0.5 Gy/hr의 선량률로 총 선량이 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 Gy가 되도록 저 LET 방사선을 조사한 후 MIT assay로 생존율을 측정하고 비교하였다.

분화된 췌장베타세포에 방사선을 조사하지 않았을 때는 normal 조건에 비해 hyperglycemia 조건의 생존율이 경미한 감소를 보였다. 그러나 X선의 총 선량이 점차 누적됨에 따라 normal 조건에서 생존율이 조금씩 감소하는 것에 비해 hyperglycemia 조건에서는 급격히 감소하여 시너지 효과를 나타냈다.

미분화된 신경세포에서는 방사선을 조사하지 않은 때도 normal 조건에 비해 hyperglycemia 조건의 생존율이 뚜렷하게 감소하였다. X선의 총 선량이 점차 누적됨에 따라 normal 과 hyperglycemia 조건 모두에서 비교적 급격한 세포사멸이 나타났지만 그 생존율의 감소비율이 거의 평행하게 진행되어 시너지 효과를 보이지 않았다.

**중심 단어:** 췌장베타세포, 신경세포, 저 LET, 생존율

## I. 서 론

혈중 포도당 농도에 따라 췌장 베타세포는 인슐린을 생산 분비하여 포도당의 항상성을 유지할 수 있도록 한다<sup>1)</sup>. 인슐린은 포도당 흡수를 촉진하거나 glycogen으로의 전환을 촉진하여 혈중 포도당 농도를 낮추며 세포의 생장에 중요한 역할을 한다. 당뇨병은 인슐린의 분비량이 적거나, 충분한 양임에도 제 기능을 못해 혈당치가 높아지

는 질환인데, 주로 인슐린을 분비하는 췌장 베타세포의 사멸이나 인슐린 저항성이 원인이 된다. INS-1 세포는 인슐린을 분비하는 cell line으로, 1차 배양한 베타 세포와 특성이 유사하기 때문에 인슐린이나 당뇨병 연구에 광범위하게 쓰이고 있다<sup>2-4)</sup>.

신경세포 line (neuron spinal cord hybrid cell)은 Cashman 등이 1992년에 운동뉴런이 풍부한 태아령이 12-14일인 척수세포에 aminopterin-민감성 신경아세포종(neuroblastoma)인 N18TG2를 융합하여 개발한 신경적수잡종세포의 시리즈 중 하나이다. 그 중 정해진 신경세포, 그리고 그 subclone들은 action potential을 발생시키고, acetylcholine을 생산·저장·분비하는 등 운동뉴런의 특성을 잘 나타내고 있다. 특히 신경세포는 적절한 조건하에서 신경 발달 단계를 답습하는 분화 패턴을 보여 주기 때문에 생리학과 병리학 등에서 배양모델로서 널리

\* 접수일(2013년 12월 19일), 1차 심사일(2014년 2월 10일), 확정일(2014년 3월 13일)

교신저자: 김구환, (702-722) 대구광역시 북구 영송로 15  
대구보건대학교 방사선과  
Tel : 053-320-1320, FAX: 053-320-1449  
E-mail : kimgh@dhc.ac.kr

사용되고 있으며, 뇌 퇴행성 질환 및 뇌 관련 질병(치매, 파킨슨병, 뇌염 등)의 ganglioside에 대한 돌연변이 유전자와 신경세포 수의 변화 때문에 유발되는 것 등을 연구하는 재료로 각광받고 있다<sup>5)</sup>.

고 LET 방사선 조사가 생물체에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 이루어져 있는 반면, 저 LET의 방사선이 과연 생물체에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구는 많이 부족한 것이 사실이며, 그나마 논란의 대상이 되고 있는 실정이다<sup>6-8)</sup>. 그리고 방사선 생물학 연구의 대부분은 방사선이 어떻게 생물체의 생리적인 변화를 일으키는 지에 대한 연구였으며, 생리적인 조건이 어떤 식으로 방사선의 생물학적 효과에 영향을 미치는 지에 대한 연구는 극히 미흡한 실정이다.

본 실험에서는 임상적인 연구에 많이 사용되는 췌장베타세포와 신경세포에 저 LET X-선을 낮은 선량률로 조사함으로써, 세포 종류에 따라 다르게 나타나는 생물학적 효과, 총 선량에 대한 생존 곡선, 세포 수준에서 방사선의 생물학적 효과를 확인하는 기초자료를 제공하고자 한다.

## II. 연구 방법

### 1. 세포배양

췌장베타세포의 배양을 위해 완전배지의 일종인 RPMI-1640 (Gibco-BRL, Grand Island) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 11.1 mM glucose, 1% penicillin-streptomycin, 1% sodium pyruvate (Sigma Chemical Co. NY, USA), 50  $\mu$  M 2-mercaptoethanol 을 첨가하여 사용하였다. -196°C 액체 질소 탱크에 냉동/보관 하던 INS-1 세포를 37°C 항온수조에서 해동시킨 다음 배지를 첨가하고 1000 rpm에서 3분 원심분리 실시한 다음 세척 후 100 mm cell culture dish에 넣고 37°C CO<sub>2</sub> incubator (vision : VS-9108MS, 5% CO<sub>2</sub> - 95% air)에서 배양하였다.

신경세포의 배양에는 RPMI-1640배지에 10% FBS, 11.1 mM glucose, 1% penicillin-streptomycin, 1% sodium pyruvate를 첨가하여 사용하였으며, 37°C CO<sub>2</sub> incubator (vision : VS-9108MS, 5% CO<sub>2</sub> - 95% air)에서 배양하였다.

### 2. X-ray 조사

X-ray 치료 장치인 치료용 simulator (SIMENS)로

X-선을 조사하였다. 먼저 초점과 세포와의 거리를 72 cm로 정하고, 세포가 위치하는 곳 바로 밑에 survey meter가 장착하였다. X-선은 106~110 kV, 4.0 mA로 세포에 조사하였으며, 선량률은 0.5 Gy/hr로 하였다. 그리고 총 선량이 각각 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 Gy가 되도록 survey meter로 지속적으로 확인하였다. 조사 시 콜리메이터(35cm × 35cm) 안에 들어오는 X-선의 조사면적을 최대한 줄였으며, 주기적으로 plate의 위치를 조금씩 변경하며 진행했다.

### 3. Cell proliferation assay : MTT assay

미분화 췌장베타세포를 96 well cell culture plate에 100  $\mu$  L 안에  $4 \times 10^4$  개의 세포가 되도록 조절한 후 세포를 심었다. 그리고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 방사선을 연속 조사하였다. 분화된 췌장베타세포 대상 실험에서는  $3 \times 10^4$  cells로 심은 후 48시간 동안 세포가 부착하고 분화할 시간을 부여했으며, 이후 정상적인 배양액과 hyperglycemia 조건의 배양액(1% FBS, 30 mM glucose) 상태로 24시간 배양한 후 X-선을 연속 조사하고 MTT assay를 하였다.

신경세포의 경우  $2 \times 10^4$  cells로 심은 후 48시간 동안 세포가 충분히 부착하여 왕성하게 분열할 수 있는 시간을 부여했으며, 정상적인 배양액과 hyperglycemia 조건의 배양액(1% FBS, 30 mM glucose) 상태로 24시간 배양한 후 X-선을 연속 조사하고 MTT assay를 하였다.

MTT assay는 PBS에 5 mg/mL의 농도로 녹인 MTT (Sigma Chemical Co. NY, USA)를 plate의 각 well에 최후 농도의 10%가 되도록 분주하여 3~4시간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시켜 보라색의 불용성 formazan 이 형성되는 것을 확인하였다. Formazan을 녹이기 위하여 염산이 첨가된 10%의 SDS 용액을 각 well에 100  $\mu$  L 씩 분주하고 16~20시간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 뒤 ELISA-Well plate reader (DENLEY, Japan)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 통계처리

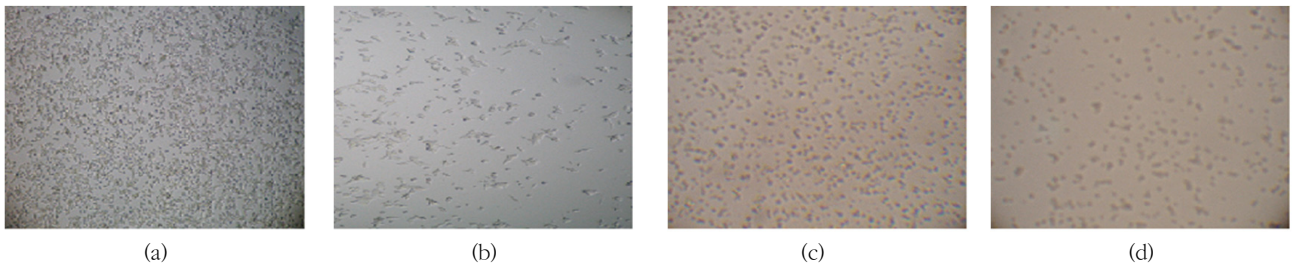
Student's T-test를 통하여 유의성을 확인하였다.

### III. 연구 결과

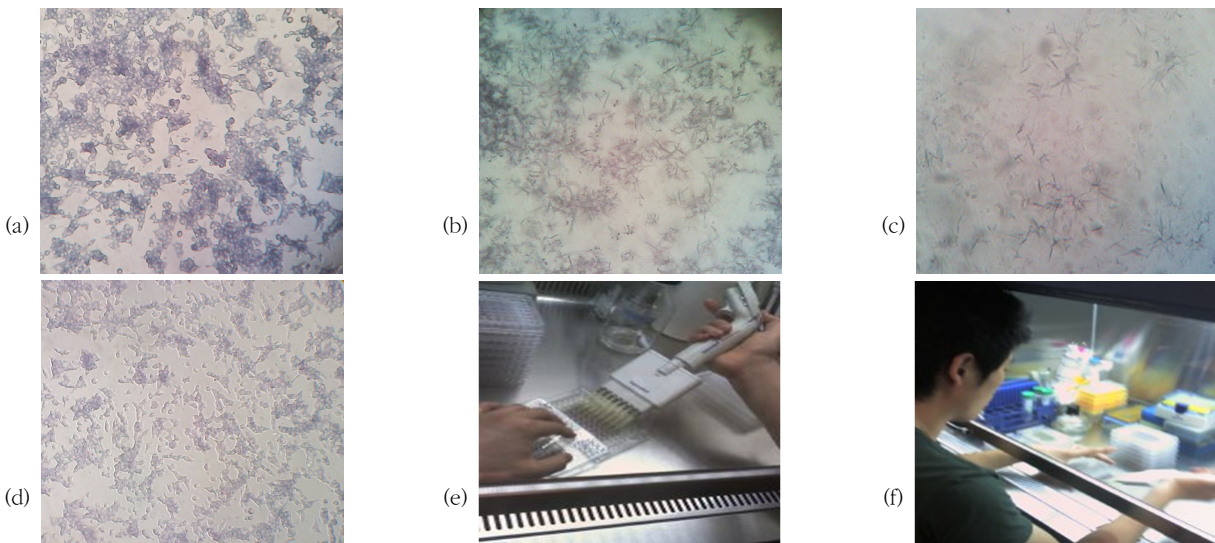
10% FBS(fetal bovine serum), 11.1 mM glucose에서 배양된 미분화 췌장베타세포에 저 LET X-선 연속 조사 전과 후의 상태를 위상차현미경으로 관찰하였다. Normal 배양조건과 hyperglycemia 배양조건(1% FBS, 30 mM glucose)에서 24시간 배양한 분화된 췌장베타세포를 각각 방사선에 노출되지 않은 그룹과 5 Gy까지 노출된 그룹으로 나누어 위상차현미경으로 관찰하였다(Fig. 1).

Normal 배양조건과 hyperglycemia 배양조건(1% FBS, 30 mM glucose)에서 분화된 췌장베타세포에 저 LET X-선 조사 전과 후의 상태를 위상차 현미경으로 관찰하였다. 전자마이크로피펫을 통해 MTT 용액과 solvent 용액을 첨가한 반응을 관찰하였다(Fig. 2).

X-선 조사가 췌장베타세포의 생존율을 조사하기 위해 췌장베타세포의 normal 과 hyperglycemia 조건으로 구분하여 X-선을 연속 조사하여 총 선량이 1, 2, 3, 4, 5 Gy에 도달하도록 하였다. 그 후 24시간 동안 안정시킨 다음 MTT assay를 통해 생존곡선을 그렸다. Figure 3A에 제시한 것과 같이 0.5 Gy/hr의 낮은 선량률로 조사해서 총 선량이 5 Gy가 될 때까지 관찰하였을 때, normal 조건에서는 데이터 값이 비교적 고르게 분포하였으며 생존율은 87%에서 102%까지 변화였다. 생존곡선의 경향을 추세를 통해 확인하였을 때 기울기가 거의 없는 직선을 보였다. 그러나 Figure. 3B에 해당하는 hyperglycemia 조건에서는 값이 고르지 못하고, 생존율은 73%에서 102%까지 변화였고, 추세선이 많이 기울어진 것을 확인하였다.



**Figure 1.** Pancreatic  $\beta$ -cell of normal condition in phase contrast  
 (a) Non-irradiated blast cell (b) 5 Gy irradiated blast cell  
 (c) Non-irradiated cell differentiation (d) 5 Gy irradiated cell differentiation



**Figure 2.** MTT assay  $\beta$ -cell of pancreas  
 (a) Non-irradiated normal condition blast cell (b) 5 Gy X-ray irradiated normal condition blast cell  
 (c) Non-irradiated hyperglycemia blast cell (d) 5 Gy X-ray irradiated hyperglycemia blast cell  
 (e) MTT assay by micropipette (f) Solvent solution assay by micropipette

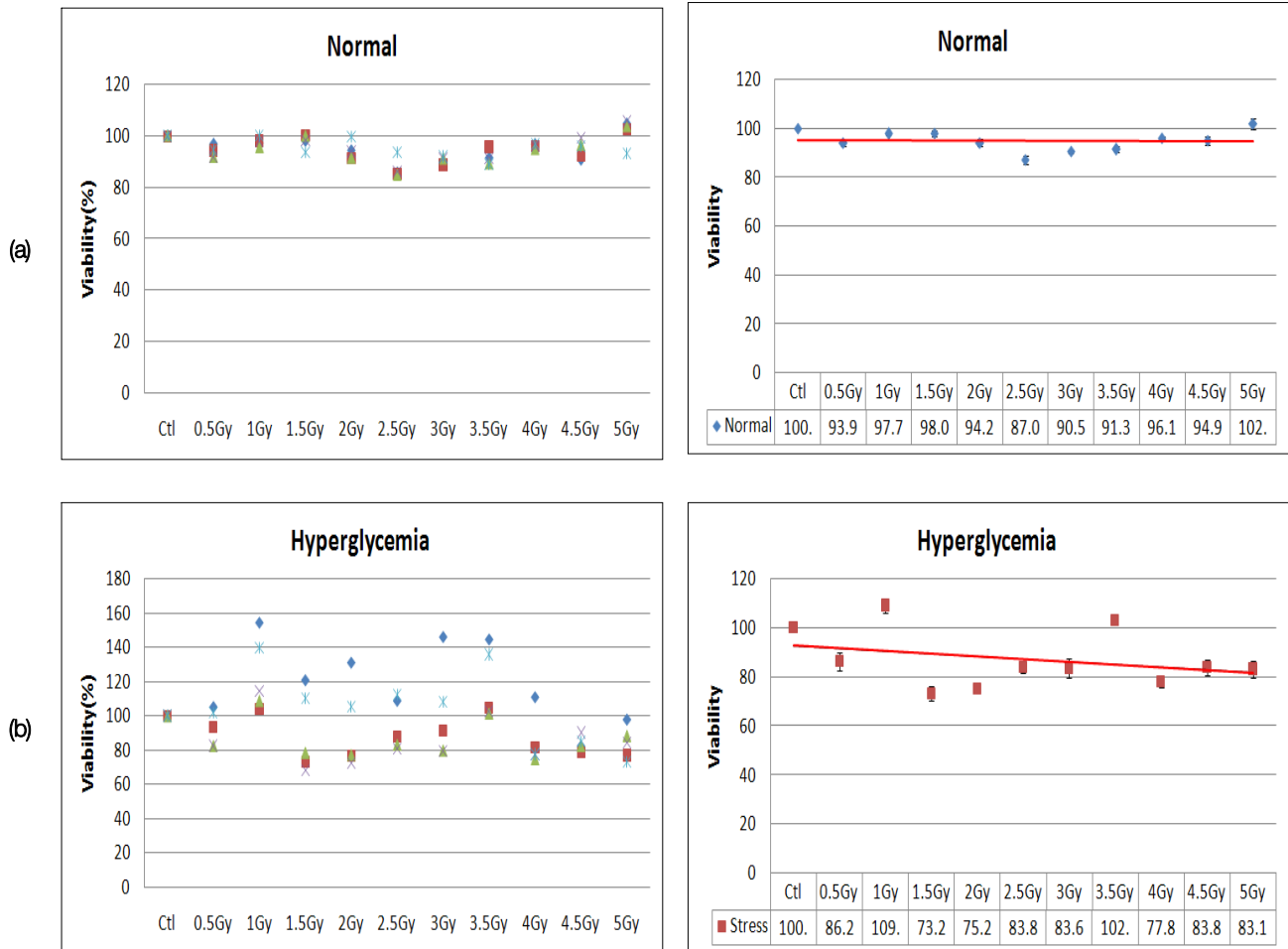
저 LET X-선을 낮은 선량률로 조사하였을 때, normal 조건과 hyperglycemia 조건에서의 췌장베타세포의 생존율 변화를 직접적으로 비교하였다(Fig. 4). Normal 조건에서는 생존곡선의 경향성은 기울기가 거의 없거나 생존율이 control(대조군)보다 약간 더 증가한 듯 나타나지만, hyperglycemia 조건에서의 생존곡선은 X-선의 총 선량이 증가할수록 현격하게 생존율이 감소하였다(Fig. 4).

Normal 배양조건과 hyperglycemia 배양조건에서 24 시간 배양한 미분화 신경세포와 분화 신경세포를 관찰하였다(Fig. 5).

X-선 조사에 대해 세포들은 어떤 반응을 보이는지 확인하고자 췌장베타세포의 실험과 동일하게 저 LET X-선

을 0.5 Gy/hr로 신경세포에 조사하였다. normal 조건 (10% FBS, 11.1 mM glucose)의 미분화 신경세포를 X-선의 총 선량이 4.5 Gy에 이르도록 조사하였을 때 생존율의 변화범위가 80.48%~100%였으며, 생존곡선의 경향은 총 선량이 증가함에 따라 상당히 많은 세포가 사멸되었다(Fig 6.a). hyperglycemia 조건 (1% FBS, 30 mM glucose)에서 데이터 값의 분포가 normal 조건보다 다소 흩어져있고 생존율의 변화범위가 71.93%~100%로 다소 넓으며, 총 선량이 증가함에 따라 뚜렷한 세포 사멸을 나타내는 급격한 기울기를 가지고 있었다(Fig. 6b).

Normal 조건과 Hyperglycemia 조건의 데이터를 비교하였을 때, 두 데이터 모두 상당한 기울기를 가지고 있으



**Figure 3.** Survival curve of X-ray irradiated pancreatic  $\beta$ -cell  
 (a) Normal culture condition (10% FBS, 11.1 mM glucose)  
 (b) Hyperglycemia culture condition (1% FBS, 30 mM glucose)

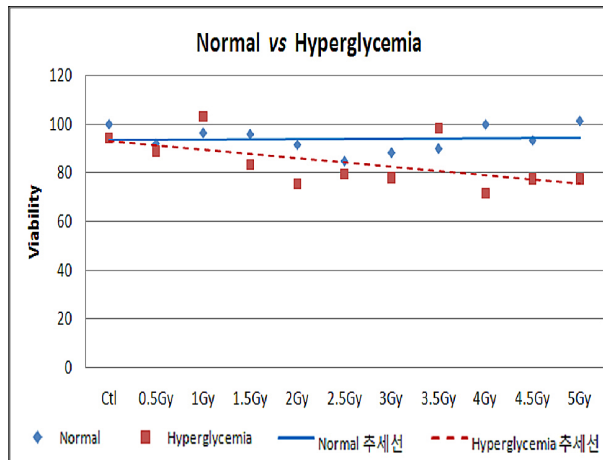


Figure 4. Survival rate comparison of normal and hyperglycemia culture condition on pancreatic  $\beta$ -cell  
 \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (Student's t - test)

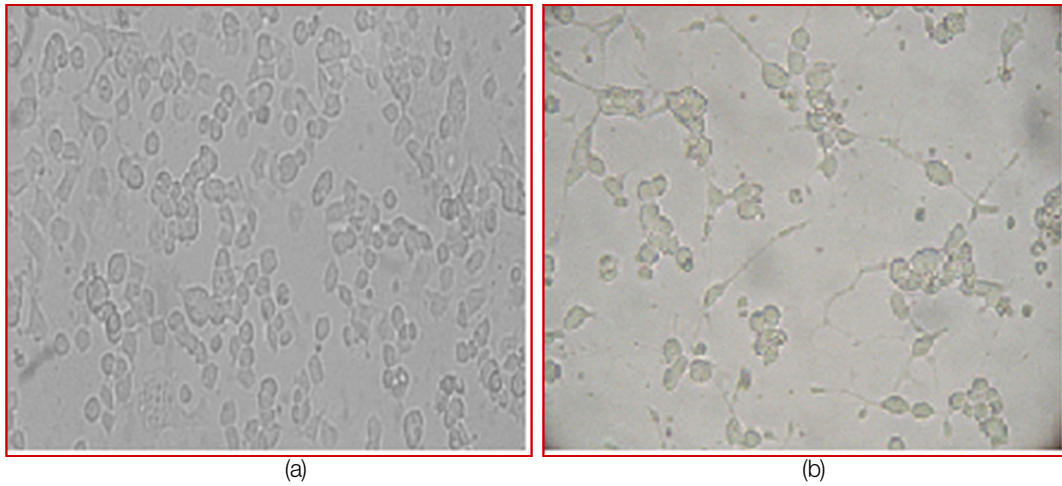
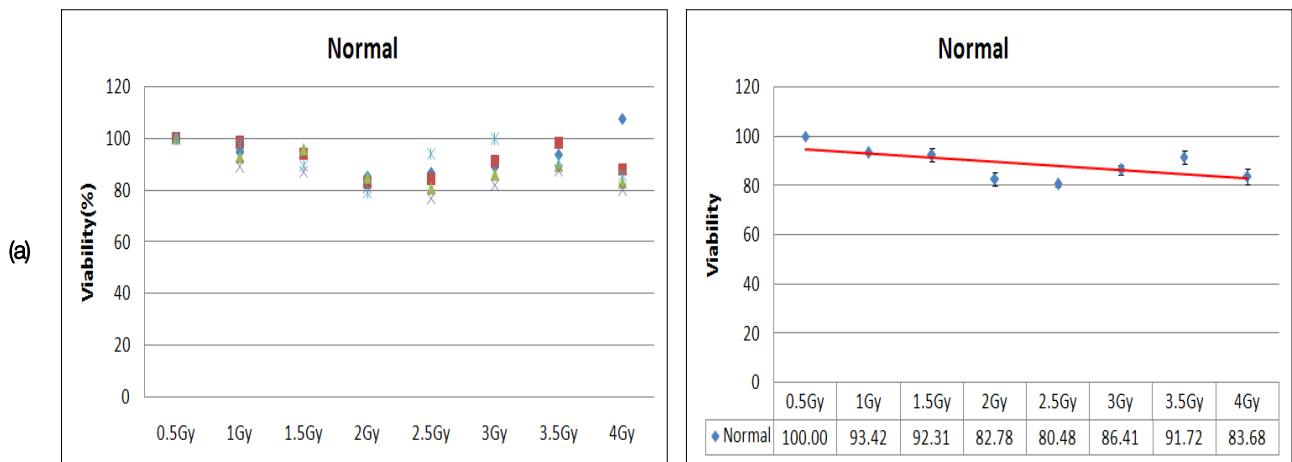


Figure 5. Nerve cell at phase microscope  
 (a) Undifferentiated nerve cell (b) Differentiated nerve cell



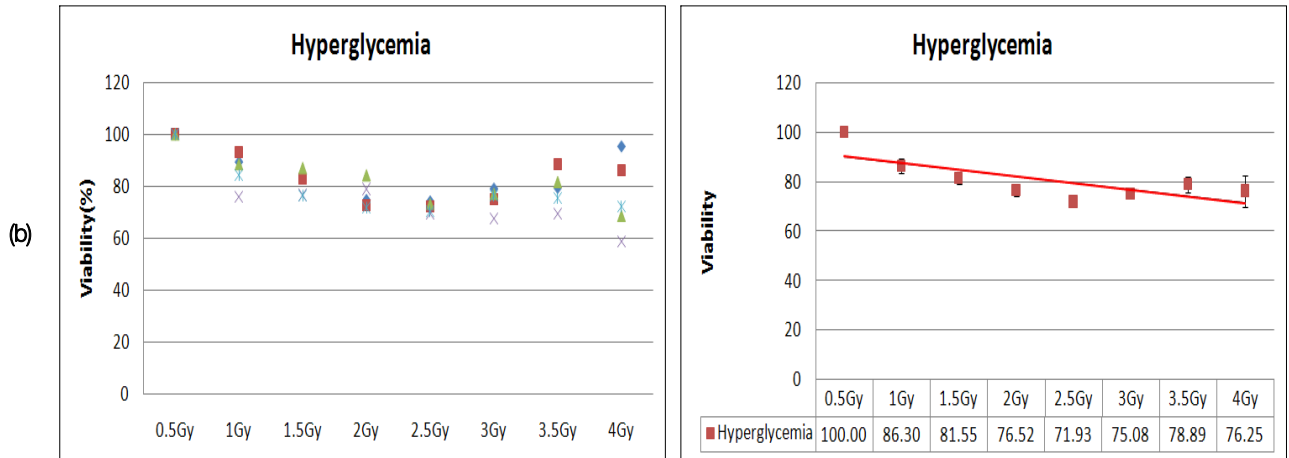


Figure 6. Survival curve of X-ray irradiated nerve cell  
 (a) Normal culture condition (10% FBS, 11.1 mM glucose)  
 (b) Hyperglycemia culture condition (1% FBS, 30 mM glucose)

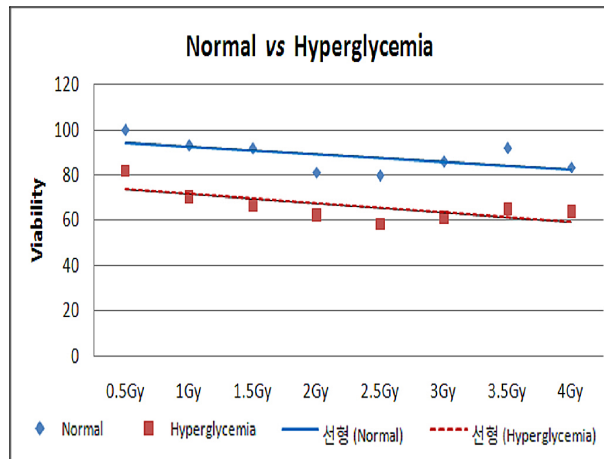


Figure 7. Survival rate comparison of normal and hyperglycemia culture condition on nerve cell  
 \*\*, p<0.01 (Student's t - test)

며, 또한 그 기울기는 거의 같음을 알 수 있다. 그리고 총 선량이 4 Gy에서의 생존율은 약 80%와 60%로 낮게 나타나고 있었다(Fig. 7).

#### IV. 고찰 및 결론

##### 1. 췌장베타세포

미분화된 췌장베타세포에 X선을 0.5 Gy/hr의 선량률로 조사한 후 위상차현미경에서는 뚜렷한 세포수의 감소를 확인할 수 있었으나, 정량화하기 위한 MTT assay에서는 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다. 그리고 측정된 데이터로부터 경향성을 알아보기 위해 선형추세선을 적용하여 분화된 췌장베타세포 실험에서 방사선에 노출되지 않은

대조군을 보면, normal 조건에 비해 hyperglycemia 조건에서 좀 더 많은 세포수가 있었지만 그 정도가 미미했다.

Normal 조건에서 총 선량이 증가함에 따라 미미한 수준으로 세포가 사멸된데 비해 hyperglycemia 조건에서는 사멸한 세포의 수가 현저하게 증가하였으며, 이때 시너지 효과가 관찰되었다. 고혈당 조건이 세포나 조직개체에 미치는 영향을 췌장베타세포에 국한하여 보자면, 기본적으로는 고혈당 조건이 세포 내 산화 과정을 촉진시키고, 그로 인해 과량의 ROS를 생성시키는 중요한 요인이 되고, 이로 인한 산화적 스트레스가 췌장베타세포를 죽게 하는 것으로 보고되어 있다<sup>9-10</sup>. 고혈당 조건에 의해 손상된 세포에서 과다 생성되는 포도당 유래분자 메틸글리옥살(methylglyoxal)이 망막에서 미세혈관의 소실에 중추

적 역할을 하는 혈관증식인자-2란 유전자를 활성화하며, 고혈당 조건이나 혈당이 증가하는 경우 세포의 손상정도가 크게 나타나서 여러 가지 질병으로 발전하고 암 발병 위험성도 증가시키기 때문에 주의가 요망된다<sup>11-12)</sup>.

췌장베타세포는 고혈당 조건으로 인해 ROS의 공격을 받는 상태에서 X선에 장시간에 걸쳐 노출되기 때문에 DNA를 비롯한 세포내부의 손상이 클 것이라는 사료된다. ROS는 불안정하지만 대단히 빠른 속도로 반응하고 증폭되기 쉬운 속성을 가지기 때문에 지속적인 방사선 조사는 상당한 영향을 발휘하게 된다. 이와 같은 결과는 현미경을 통한 관찰에서 고혈당 조건과 방사선 조사에 의해 세포의 apoptosis 가 나타나는 것으로 사료된다.

## 2. 신경세포

신경세포는 세포의 부착이 대단히 빠르며 세포 분열 역시 상당히 활발하게 일어나는데 반해, 일반적인 배양조건에서는 잘 분화하지 않는 세포로 알려져 있다. X선에 노출시키지 않은 채 normal과 hyperglycemia의 조건에서 세포 반응을 보면, hyperglycemia 조건의 세포는 세포사멸이 상당히 진행되었다는 것을 알 수 있다. 그리고 X선의 총 선량이 증가함에 따라 두 조건 모두에서 췌장 베타세포에 비해 급격한 세포사가 관찰되었지만, 그 감소율이 거의 같기 때문에 시너지 효과를 발견할 수 없었다.

일반적으로 신경세포는 방사선에 대해서 높은 저항성과 낮은 감수성을 가지는 세포로 알려져 있는데, 이것은 아마 발생 초기를 제외하고 신경세포는 대부분의 시간을 G1/G0기이고, 반대로 가장 약한 시기가 S기 인데 성인의 신경세포의 경우 S기에 머무는 높은 저항성을 시간이 없기 때문에 가지는 것으로 이해된다. 췌장베타세포에서 hyperglycemia 조건 실험 데이터의 분포에 비해 신경세포의 데이터의 분포가 비교적 고른데, 췌장베타세포에 비해 신경세포에서 X선이 끼칠 수 있는 영향력이 크며, 그것은 곧 췌장베타세포에 비해 신경세포의 저항성이 더 낮다는 것을 의미하는 것이다<sup>13)</sup>. 본 실험에서, 신경세포도 고혈당 조건에 상당히 취약하며, 일정 선량 이상의 X선에 노출되면 더욱 많은 세포사멸로 이어질 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 연구의 여건상 제한된 세포주로 이루어 졌으며, 저 LET X선만의 조사를 통한 실험이므로 모든 세포에 걸쳐 적용할 수는 없다.

앞으로 중성자선, 양성자선 등과 같은 방사선의 생물학적 효과에 대해서 지속적으로 연구가 이루어져야 방사선의 활용 범위와 효율성이 증가 될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Bo-Ra Im : Pancreatic beta cells to GLP-1's Glucosamine by toxicity protection mechanisms, Gye-myong University Master's dissertation, 2007
2. Yan Yang and Kevin D. Gillis : A highly  $Ca^{2+}$ -sensitive Pool of Granules Is Regulated by Glucose and Protein Kinases in Insulin-secreting INS-1 Cells. Department of Biological Engineering, 2 Department of Medical Pharmacology and Physiology, and 3 Dalton Cardiovascular Research Center, University of Missouri-Columbia, Columbia, MO 65211
3. Keun-Gyu Park, Kyeong-Min Lee, Hye-Young Seo, Ji-Ho Suh : Glucotoxicity in the INS-1 Rat Insulinoma Cell Line Is Mediated by the Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner. Original Article, DIABETES, 56, 2007
4. Kyu Chang Won, Jun Sung Moon, Ji Sung Yoon, Kyung Ah Chun, Ihn Ho Cho : A-Protective Role for Heme Oxygenase-1 in INS-1 Cells and Rat Islets that are Exposed to High Glucose Conditions. J Korean Med. Sci., 21, 418-24, 2006
5. Seigou Usuki, Neil R. Cashman, and Tadashi Miyatake : GM2 Promotes ciliary Neurotrophic Factor-Dependent Rescue of Immortalized Motor Neuron-Like Cell(NSC-34). Neurochemical Research, 24(2), 281-286, 1999
6. Feinendegen, LE., Bend VP., Booz J., and Muhlensiepen H. : Biochemical and cellular mechanisms of low-dose effects. Int. J. Radial. Biol., 23-53, 1988
7. Prasad AV., Mohan N., Chandrasekar B., and Meltz ML. : Induction of "immediate early genes" by Low dose ionizing radiation. Radial. Res., 143-263, 1995
8. Liu SZ., Zhang YC., Mu Y., Su X., Liu JX. : Thymocyte apoptosis in response to low-dose radiation. Mutat. Res., 175-358, 1996
9. Marshak S et al: Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. Diabetes; 48(6), 1230-6, 1999
10. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N:

- Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes*; 48(4) 738-44, 1999
11. Jeong-Won Im : The relevance of diabetes management of the amount of stress associated with life events in diabetic patients. *Korea Diabetes Association*, 25(3), 240-247, 2001
  12. Efanova IB et al: Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. *J Biol Chem.*, 273(50), 33501-7, 1998
  13. Elisabetta babetto, AM, MR : tetracycline-regulated gene expression in the NSC-34-tTA cell line for investigation of motor neuron disease. *Molecular Brain Research* 140, 63-72, 2005

---

• Abstract

## Effect on Pancreatic Beta Cells and Nerve Cells by Low LET X-ray

Kwang-hun Park · Kgu-hwan Kim<sup>1)</sup>

*Department of Nuclear Medicine, Kyungbuk National University Hospital*

<sup>1)</sup>*Department of Radiological Technology, Daegu health College*

Cultured pancreatic beta cells and nerve cells, it is given normal condition of 10% FBS (fetal bovine serum), 11.1 mM glucose and hyperglycemia condition of 1% FBS, 30 mM glucose. For low LET X-ray irradiated with 0.5 Gy/hr dose-rate (total dose: 0.5 to 5 Gy). Survival rates were measured by MIT assay.

When non irradiated, differentiated in the pancreatic beta cells experiment is hyperglycemia conditions survival rate compared to normal conditions survival rate seemed a small reduction. However increasing the total dose of X-ray, the survival rate of normal conditions decreased slightly compared to the survival rate of hyperglycemia conditions, the synergistic effect was drastically reduced.

When non irradiated, undifferentiated in the nerve cells experiment is hyperglycemia conditions survival rate compared to normal conditions survival rate seemed a large reduction. As the cumulative dose of X-ray normal conditions and hyperglycemia were all relatively rapid cell death. But the rate of decreased survivals by almost parallel to the reduction proceed and it didn't show synergistic effect.

---

**Key Words :** pancreatic beta cells, nerve cells, Low LET, survival rate