01' 춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

저선량율 β선의 연속 조사시 세포의 변화 관찰

G2 arrest and apoptosis of cultured Raji cells by continuous low dose rate beta irradiation therapy with 188Re-perrhenate.

임수정, 김은희, 이태섭, 우광선, 정위섭, 이수진, 최창운, 임상무

원자력병원
서울시 노원구 공릉동 215-4

요 약

베타선 방출 방사성 핵종의 지수함수적으로 감소하는 저선량율의 β선에 의한 연속조사는 세포고사로 알려진 세포죽음에 의해서 사멸된다. 본 실험은 저선량의 베타 방출방사성 핵종에의해서 유발되는 DNA 의 변화에 의한 세포주기상의 G2 기의 지연현상과 세포고사를 관찰하고자 하였다. B 세포 lymphoma 인 Raji 세포를 Monte Carlo Method에 의해 4시간 조사 배양시 0.4Gy(0.0098mCi), 4Gy(0.098mCi), 40Gy(0.98mCi)가 되도록 ^{188}Re을 배양액에 직접 투여하여 4시간 배양한 후 새로운 배양액으로 세척하고 재접종하여 2, 4, 8, 16, 24 시간까지 배양하여 이때 발생하게 되는 세포내 염색체의 변화는 세포유속기를 통하여 분석하고 세포고사는 Annexin-V와 PI 염색과정을 통하여 분석하였다. 세포의 생존율을 방사선량에 따라서 감소하는 양상을 나타내었으며, 40Gy를 조사받은 세포에서는 세포괴사에 의해서 초기단계에서 Annexin-V와 PI 의 결합이 증가된 양상을 나타내었고 0.4Gy를 조사받은 경우에는 Annexin-V만이 서서히 결합이 증가하는 양상을 나타내면서 후반부에 PI의 결합이 증가하는 것으로 나타나서 이는 세포고사(apoptosis)에 의한 세포죽음으로 관찰되었다. 0.4Gy를 조사받은 경우 조사경과 16시간후에 G2 세포주기의 지체현상이 나타났으나 40Gy를 조사받은 경우에는 2시간이내에 염색체의 분절현상이 나타났다. DAPI 염색결과 초기 핵의 상해는 40Gy를 조사받은 경우에만 나타났으며 0.4Gy를 조사받은 경우에서는 서서히 apoptotic body가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 지속적인 저선량의 방사선의 조사는 세포주기상의 G2 지체현상과 점진적인 세포고사를 유도하는 것으로 생각되며 고선량의 연속조사의 경우에는 세포괴사를 유발하는 것으로 확인되었다. 그러므로 베타방출체 방사성 동위원소를 이용한 방사성의약품을 통한 저선량의 연속조사를 통한 치료가 보다 효과적인 방사선 조사 치료방법이라고 생각된다.

Abstract

Beta emitting radionuclide therapy gives exponentially decreasing radiation dose rate and results in cell death presumably by apoptosis. We observed changes in DNA content and apoptosis in relatively low dose rate beta irradiation. Raji cells were cultured and

incubated with 188Re-perrhenate (3.7MBq, 37MBq, or 370MBq/ml) for 4 hours to give irradiation dose of 0.4, 4, or 40 Gy. After changing the culture media, cells were cultured for 2, 4, 8, 16, and 24 hours. The cells were stained with Trypan blue, Annexin-V and Propidium Iodide (PI) to observe cell viability, cell membrane alteration by apoptosis and changes in DNA content respectively. Flowcytometry was done for Annexin-V and PI to quantitate apoptosis and necrosis in the irradiated cells. DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) stain was also done to observe the damage in the nucleus. Cell viability decreased with an increasing radiation dose. Cells irradiated in 40 Gy showed early uptake of both Annexin-V and PI suggesting cell death by necrosis. Cells irradiated in 0.4 Gy showed delayed uptake of Annexin-V only, and later on PI uptake suggesting cell death mainly by apoptosis. The cells irradiated in 0.4 Gy showed G2 arrest in 16 hours after irradiation, but the cells irradiated in 40 Gy showed early DNA fragmentation within 2 hours after irradiation. In DAPI stain, early nucleus damage was observed in the cells irradiated in 40 Gy. On the other hand, slowly increasing apoptotic bodies were observed in the cells irradiated in 0.4 Gy. These results suggest that continuous low-dose irradiation induces G2 arrest and progressive apoptosis in cells while continuous high-dose irradiation induces rapid necrosis. Therefore, we expect therapeutic effect by continuous low-dose rate irradiation with beta emitting radiopharmaceuticals.

서 론

방사성동위원소에 의한 체내조사는 방사능의 지수함수적 감소에 방사선에 의해서 세포손상이 일어난다는 것은 잘 알려진 사실이다.1) 방사성 동위원소에 의한 체내 조사는 방사능의 지수함수적 감소에 의한 저선량율 베타입자의 연속조사이다. 세포의 DNA에 방사선의 에너지가 흡수되면 DNA가 절단되고 최종적으로는 세포장해를 일으키게 된다. 세포장해 중 세포고사(apoptosis)는 방사선에 노출된 세포가 세포사를 일으키는 것으로 세포괴사(necrosis)와는 형태학적으로 차이가 있다.

세포고사와 세포괴사의 형태학적 차이	
세포고사	세포괴사
세포크기축소	미토콘드리아 확장
Membrane belbing	내형질막의 확장
세포고사 소체	원형질막의 확장
염색체의 응축	전해질 이동에 장애
핵의 분절현상	세포용해 현상
염증반응 없음	염증반응 동반

저선량율 베타입자의 연속조사에 의해 세포고사(apoptosis)가 진행된다. 세포고사(apoptosis)에 의해 죽어 가는 세포는 대식세포에 잡아 먹히게 되는데, 대식세포가 고사세포를 인식하는 기전으로 세포막의 이중 지질구조 중 세포 안쪽에 위치하는 phosphatidyl serine이 세포 밖으로 뒤집어져 나오는 것을 대식세포가 인식한다고 보고되었다.[2] Annexin이라는 물질은 칼슘 존재하에서 음이온을 띤 지질 단백에 선택적으로 결합하는 단백질인데, 이 중 annexin V가 특히 phosphatidyl serine과 선택적으로 결합한다는 사실이 밝혀졌으며[3], 이를 이용하여 세포고사를 정량적으로 진단할 수 있는 방법이 고안되었는데, phosphatidyl serine에 annexin V가 결합하는 것을 이용하여 annexin V에 형광물질인 FITC (fluorescein isothiocyanate)를 붙이는 것이다. Annexin V에 형광을 내는 물질인 FITC를 결합시키면 고사세포의 세포막에 붙어 형광을 내므로 유세포계측기에 의해 정량적으로 측정할 수 있게 된다. 한편 세포핵의 손상은 Propidium Iodide (PI)를 이용한 유세포계측으로 측정할 수 있으므로 이상의 두가지 형광물질을 이용하여 세포막과 세포핵의 변화를 동시에 검사하여 세포고사를 연구하는 것이 가능하다.[4] ^{188}Re β선은 지수함수적 저선량율의 연속조사시 세포괴사가 기대되지 않는 저선량에서도 세포고사에 의한 세포사망이 기대된다. 방사선에 의한 세포고사 진행과정에서 P53, P21등의 유전자가 발현된다. 이 유전자의 발현은 세포주기상의 G2 정지현상을 야기하며 이는 염색체의 응축, 분절등을 일으켜 t세포고사(apoptosis)를 유도한다. 이에 본 연구에서는 지수함수적으로 감소하는 저선량율의 β선에 의한 연속조사 후 조사선량과 조사시간에 따른 세포고사가 어느 정도 일어나는지에 대해 annexin V와 PI로 이중염색하여 유세포계측기를 이용한 검사법으로 정량화하여 서로 비교해보고, DNA content를 비교 분석하여 G2 arrest를 거쳐 apoptosis로 진행되는 과정을 정량적으로 밝혀보고자 하였다.

방법

1. 대상

ATCC로부터 분양받은 Burkitt's lymphoma cell line인 Raji cell을 사용하였다.

2. 세포배양

Raji cell을 culture flask에 1.0 x 10^6개씩 분주한 후 RPMI 1640 (0.05% L-glutamin, 20mM HEPES, 50*ug*/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum) 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.
48시간 후 배양액을 교환하면서 cell을 1.0 x 10^5개씩 24well culture plate에 접종하여 배양하였다.

3. 방사선 조사

Monte Carlo Method에 의해 4시간 조사 배양시 0.4Gy(0.0098mCi), 4Gy(0.098mCi), 40Gy(0.98mCi)가 되도록 ^{188}Re을 24well culture plate 배양액에 직접 투여하여 4시간 배양한 후 새로운 배양액으로 1회 세척하고 재접종하여 2, 4, 8, 16, 24 시간까지 배양하였다.
이 때 ^{188}Re은 배양액으로 희석하여 원하는 선량이 되도록 한 후 사용하였다.

4. 세포수확

Raji cell line은 suspension cell line이기 때문에 pipette으로 서너차례 up&down하여 15ml falcon tube에 옮겨 1,000rpm에서 3분간 원심분리하고 배양액을 이용하여 1회 세척하였다.

5. Trypan blue exclusion test

조사선량과 조사시간에 따른 cell의 생존율을 관찰하기 위하여 각 시간별로 수확한 세포의 일부(50*ul*)를 취하여 동량의 0.5% trypan blue 용액과 잘 섞어준 후 광학현미경하에서 hemocytometer로 계수하였다.

6. 유세포계측

방사선 조사 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 2, 4, 8, 16, 24 시간 동안 배양한 다음, 이를 꺼내어 1,000rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음, 다시 1,000rpm에서 1회 세척하여 10^5 - 10^6개의 세포를 모았다.
Bender MedSystem사의 Annexin V-FITC kit를 사용하여 세포를 형광염색하였다.
이를 간단히 요약하면 세포 부유액 185*ul*, annexin V-FITC 5*ul*, PI 10*ul*를 혼합하여 실온, 차광상태에서 10분간 염색한 후 결합완충액 200*ul*를 첨가하여 바로 유세포계측기로 측정하였다. 아울러 방사선에 의한 cell cycle의 변화를 관찰하기 위해서 PI 염색하여 DNA content를 역시 유세포계측기로 측정하였다.

7. DAPI 염색

방사선 조사로 인한 세포핵의 변화를 좀 더 자세히 관찰하기 위하여 DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma) 시약을 사용하였다.
이를 요약하면 각 시간별로 수확한 세포를 슬라이드글라스에 도말하여 공기중에서 건조시켰다. 완전 건조된 슬라이드글라스를 PBS로 3회 세척한 후 DAPI sol.을 4ug/ml의 농도로 도말 표본위에 중첩시키고 10분간 암실에서 염색하였다.
10분 후 PBS로 3회 세척한 다음 50% glycerol로 봉입하여 형광현미경으로 세포고사소체를 계수하였다.

결 과

1. 조사선량과 조사 후 배양시간에 따른 세포생존율 변화 (표.1)

조사선량과 조사 후 배양시간별 세포 생존율 관찰시 조사선량이 높을수록 조사 후 배양시

간이 길수록 세포생존율은 방사선을 조사하지 않은 대조세포군에 비해 유의하게 낮았다.

표.1 조사선량과 조사 후 배양시간에 따른 세포생존율 변화 (%)

hr / Gy	2	4	8	16	24
Control	84.6±0.32	81.1±1.76	79.4±1.95	75.6±1.45	73.5±1.39
0.4	79.2±2.41	75.6±1.23	71.1±1.96	70.6±0.91	57.1±2.44
4	77.1±3.35	75.7±1.29	69.2±2.38	68.4±1.42	54.8±1.56
40	71.4±2.36	72.4±2.98	64.4±3.06	68.2±1.42	48.5±1.24

2. 조사선량과 조사 후 배양시간에 따른 세포고사에 대한 유세포 계측 결과 (표.2)

방사선 조사 후 배양시간이 흐름에 따라 초기 세포고사는 증가하다가 다시 감소하는 양상을 보이나, 후기 세포고사는 조사종료 직후 대조세포군 보다 유의하게 증가하였으며, 선량이 높을수록 조사종료 직후 높았고 시간의 경과에 따라 더욱 증가하였다.

표.2 조사선량과 조사 후 배양시간에 따른 세포고사에 대한 유세포 계측 결과 (%)

hr / Gy	초기 세포고사					후기 세포고사				
	2	4	8	16	24	2	4	8	16	24
0.4	1.8 ±0.85	5.3 ±0.22	7.0 ±1.70	2.5 ±0.52	2.8 ±0.19	25.1 ±1.85	30.7 ±0.95	35.1 ±2.15	49.8 ±1.36	51.5 ±1.53
4	1.6 ±0.50	5.0 ±0.30	4.0 ±1.54	3.3 ±1.90	2.5 ±0.63	30.4 ±2.48	32.0 ±0.96	48.7 ±1.11	51.1 ±0.71	58.3 ±0.61
40	2.3 ±0.55	3.6 ±0.51	4.6 ±1.89	4.6 ±0.97	3.2 ±0.43	33.7 ±1.10	36.9 ±2.28	48.9 ±1.99	54.5 ±1.44	67.1 ±0.64

3. 조사선량과 조사 후 배양시간에 따른 DNA content에 대한 유세포 계측 결과 (그림.1)

방사선을 조사하지 않은 대조세포군에 비해 0.4 Gy 조사 후 16시간 배양시 뚜렷한 G2 arrest를 확인하였다. 조사선량이 0.4 Gy 보다 높은 4 Gy에서는 더 빠른 시간에 G2 arrest가 관찰되었으며, 40 Gy의 고선량에서는 조사 직후부터 DNA fragment가 증가하는 양상을 보 였다.

4. DAPI 염색 결과 (표 3)

세포 1,000개를 계수하는 동안 관찰되는 세포고사 소체(apoptotic body)를 계수하여 %를 낸 결과 0.4 Gy의 저선량에서 조사 후 배양시간이 길어질수록 증가하는 양상을 보였으며,

40 Gy의 고선량에서도 시간이 흐를수록 증가하였다.

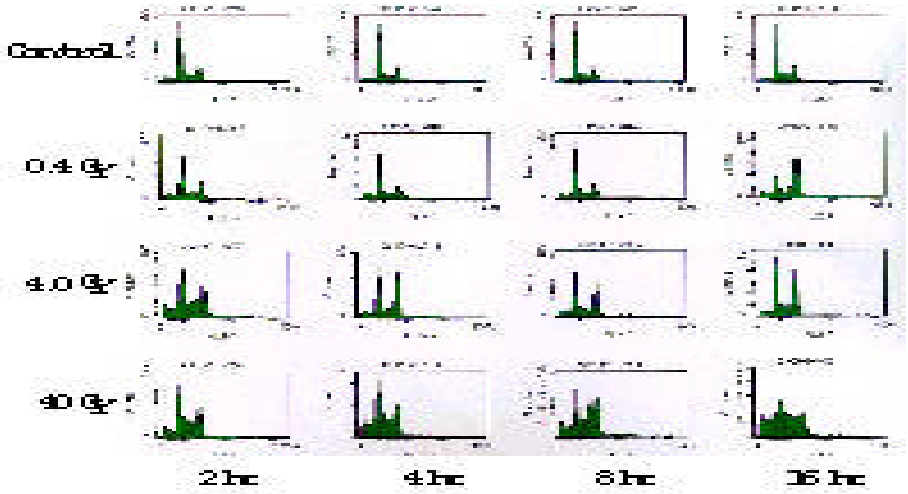

그림.1 조사선량과 조사 후 배양시간에 따른 DNA content

표.3 DAPI 염색 결과 (%)

hr / Gy	2	4	8	16	24
Control	0.8	1.0	0.9	1.2	1.3
0.4	14.9	17.2	18.8	24.5	34.4
4	13.1	15.3	18.4	20.1	29.4
40	8.6	9.2	11.4	19.5	24.8

결론

40Gy를 조사받은 세포에서는 세포괴사에 의해서 초기단계에서 Annexin-V와 PI 의 결합이 증가된 양상을 나타내었고 0.4Gy를 조사받은 경우에는 Annexin-V만이 서서히 결합이 증가하는 양상을 나타내면서 후반부에 PI의 결합이 증가하는 것으로 나타나서 이는 세포고사(apoptosis)에 의한 세포죽음으로 관찰되었다. 0.4Gy를 조사받은 경우 조사경과 16시간후에 G2 세포주기의 지체현상이 나타났으나 40Gy를 조사받은 경우에는 2시간이내에 염색체의 분절현상이 나타났다. DAPI 염색결과 초기 핵의 상해는 40Gy를 조사받은 경우에만 나타났으며 0.4Gy를 조사받은 경우에서는 서서히 apoptotic body가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 지속적인 저선량의 방사선의 조사는 세포주기상의 G2 지체현상과 점진적인 세포고사를 유도하는 것으로 생각되며 고선량의 연속조사의 경우에는 세포괴사를 유발하는 것으로 확인되었다. 그러므로 베타방출체 방사성 동위원소를 이용한 방사성의약품

을 통한 저선량의 연속조사를 통한 치료가 보다 효과적인 방사선 조사 치료방법이라고 생각된다. 방사선에 피폭된 세포가 사망에 이르는 기전이 세포고사라는 설이 있다. 세포고사 역시 세포핵에 변화가 일어나지만, 최근 고사세포를 탐식하는 탐식세포가 고사세포를 알아내는 기전이 세포막의 변화 즉, 세포막의 이중 지질구조 중 안쪽에 위치하는 phosphatidyl serine이 밖으로 뒤집어져 나오는 것을 인식한다고 보고 되었다. 이를 이용하여 세포고사를 정량적으로 진단할 수 있는 방법이 고안되었다. Phosphatidyl serine에 annexin V가 특이적으로 결합하는 것을 이용하여 annexin V에 형광을 내는 FITC를 결합시켜 유세포 계측기로 계측하면 세포막의 변화를 정량적으로 측정할 수 있다. 이와 함께 세포핵에 결합하는 PI를 동시에 사용하면 세포핵의 손상을 함께 정량적으로 측정할 수 있어 세포고사의 진행상황을 알아볼 수 있게 된다.[4] 세포고사를 알아볼 수 있는 검사법으로는 DNA가 특징적으로 분절되는 것을 전기영동하여 DNA ladder를 확인하는 방법[5], internucleosomal DNA 분절을 확인하는 TUNEL법, 세포고사 소체를 형광현미경으로 찾는 방법[6] 등 여러 가지 방법이 개발되어 사용되고 있다. 본 연구에서 사용하는 이중형광염색법은 세포막의 변화와 세포핵의 변화를 동시에 정량적으로 관찰할 수 있는 방법으로 세포막과 세포핵의 변화는 조사선량과 조사 후 배양시간에 따라 차이가 있었다. 세포막의 변화는 조사 후 배양시간의 흐름에 따라 증가하다 다시 감소하는 경향을 보였으며, 세포핵의 변화는 조사선량과 조사 후 배양시간에 따라 계속 증가하는 경향을 보였다. 이는 저선량에서는 세포막 변화가 선행되며, 조사선량에 따라 세포고사에 차이가 있는 것으로 생각된다. PI 염색으로 관찰한 DNA content 분석 결과 방사선량이 치사선량을 넘으면 G2 arrest의 증가에 비해 DNA fragment가 급격히 증가하는 것으로 보아 고선량에서는 세포핵이 영향을 빨리 받는 것으로 생각되며, 저선량에서는 G2 arrest의 증가가 현저하게 관찰되는 것으로 보아 세포고사에 의해 세포사망이 진행되는 것으로 생각된다. 즉, 세포고사는 세포막의 변화를 시작으로 세포핵의 변화로 진행되는 것이라 생각되며, β선에 의한 저선량율의 연속조사시 염색체 변화보다 세포막의 변화가 조기에 관찰되므로, 세포고사의 역할이 중요한 것으로 보인다.앞으로 더 낮은 선량에서의 변화와 조사 배양 시간을 연장할 때의 변화를 관찰하는 연구가 계속 진행되어야 할 필요가 있으며, 저선량에서 β선, γ선, Auger전자 등이 DNA에 미치는 영향을 관찰하여 그 각각 양상의 차이를 연구할 필요가 있다.

참 고 문 헌

1. Sankaranarayanan. K, Chakraborty R. Cancer predisposition, radiosensitivity and the risk of radiation-induced cancers. I. Background. *Radiat Res* 1995;143:121-143

2. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidyl serine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by marcrophages. *J. Immunol* 1992;148:2207-2216

3. Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V:effects of calcium and membrane phosphatidyl serine content. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:187-191

4. Stein L, Wang JM. Detecting apoptotic cells by flow cytometry using annexin V. *Hot*

Lines 1997;3:12-3

5. Mirkovic N, Meyn RE, Hunter NR, Milas L. Radiation-induced apoptosis in a murine lymphoma in vivo. *Radiother Oncol* 1994;33:11-16

6. Gong J, traganos F, Darzynkiewics Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218:314-319

7. Istvan Vermes, clemens Haanen, Helga steffens-Nakken, chris Reutelingsperger. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptosis cells using fluorescein labelled Annexin-V. *Joul. of Immu.methods* 1995;184:39-51

8. Mothersill C, Seymour C. Medium from irradiated human epithelial cells but human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiates cells. *Int J Radiat Biol* 1997;71:421-427

9. Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S and Seito T. Radiation-induced apoptotic cell death in human gastic epithelial tumor cells;correlation between mitotic death and apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1995;67:677-685

10. Hisako N, Kunios. X-ray-induced cell death;Apoptosis and Necrosis. *Radiat Res* 1994;140:1-9

11. Wang B, Fujita K, Watanabe K, Mitani H, Yamada T, Shima A. Induction of apoptosis in cultured midbrain cells from embryonic mice. *Rediat Res*

12. Jozo D, Michel M, Henri M. Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte γ-irradiation-induced apoptosis. *Molecular and cellular Biol* 1993;13:4875-4883