

## 감마선에 조사된 생쥐 난소의 유세포분석

### Flowcytometry of $\gamma$ -ray Irradiated Mouse Ovary

김진규, 이창주, 송강원<sup>1</sup>, 김상수<sup>1</sup>, 윤용달<sup>1</sup>

한국원자력연구소  
<sup>1</sup>한양대학교, 생물학과

#### 요 약

이온화방사선에 대한 생식세포의 생화학적 및 형태학적 효과를 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다. 미성숙 생쥐(ICR, 3주령)에  $\gamma$ -선을 선량 LD<sub>80(30)</sub>으로 전신 조사하였다. 조사 후 6시간, 12시간, 1일, 2일에 난소를 적출하였다. 적출된 난소를 조직학적으로 검경하기 위해 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였으며, TUNEL 방법에 의한 in situ 세포자연사를 면역조직화학적으로 규명하였다. 또한, 난소에서 추출한 DNA에 대한 분절화 분석 및 유세포 분석에 의한 세포주기를 분석하였다. DNA 분절화 분석을 볼 때, 이온화방사선 조사 후 6시간 후에 185, 370, 555 bp의 band를 확인함으로써 방사선에 의한 난포의 퇴화가 세포자연사를 매개로 하여 일어남을 알 수 있었다. 세포자연사를 확인할 수 있는 A<sub>0</sub> 세포주기는 이온화방사선을 조사받은 군에서 대조군에 비해 현저히 높은 값을 보였다. 이온화방사선을 조사한 후 6시간에 대조군의 H-E 염색을 기본으로 하여, DNA 분절화 현상을 관찰한 결과 6시간 군에서 TUNEL 염색은 강하게 나타났으며, DNA 분절화 현상이 진행된 난포의 수가 현저히 증가하였다. 본 실험의 결과 방사선 조사에 의해 유발되는 난포의 퇴화는 자연적인 난포퇴화와 마찬가지로 난소내 과립세포의 세포자연사에 의해 매개되며, 급성으로 진행됨을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 방사선에 의해 유발되는 세포자연사의 기작을 이해하는데 기초자료로서 이용될 수 있을 것이라 결론을 얻었다.

#### Abstract

This study was carried out to evaluate the biochemical and morphological effects of ionizing radiation on ovary. Immature mice (ICR, 3 week-old) were irradiated at a dose of LD<sub>80(30)</sub> at KAERI. The ovaries were collected after 6 hours, 12 hours, 1 day, and 2 days post irradiation. To analyze the morphological changes, histological staining with hematoxylin-eosin, immuno-

histochemical preparation using *in situ* 3'-end labeling was performed. DNA fragmentation analysis and flowcytometric evaluation of DNA extracted from whole ovary were performed. As a result of DNA fragmentation analysis, DNA fragments with 185, 370, and 555 base pairs were clearly shown at 6 hours post irradiation. The percentage of  $A_0$  cell cycle was significantly increased in the irradiated group than control. *In situ* 3'-end labeled follicles were increased at 6 hours post irradiation. The radiation-induced follicular atresia was taken place via an apoptotic degeneration. And this degeneration broke out very fast and acutely. Therefore, it was concluded that radiation-induced follicular degeneration was mediated by apoptosis as the spontaneous atresia. The present results can provide the experimental basis for studying the radiation-induced cell death.

## 서론

이온화방사선에 피폭된 세포들은 핵 및 세포질에 변화가 일어나며[1], 생체의 생식세포가 이온화방사선에 의해 소멸된다는 사실은 매우 잘 알려져 있다[2]. 그리고 이온화방사선에 대한 생체의 영향을 평가하는 방법으로 생식세포에 대한 생화학적, 형태학적 변화, 세포의 치사정도, 생식능력의 변화 및 유전적 영향 등이 연구되어 왔다[3]. X-선,  $\gamma$ -선, 중성자 및 양성자 등에 대한 미성숙 난자의 감수성 역시 매우 민감하다고 보고되었다[4].

유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 세포주기와 세포자연사에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Nucleosome의 크기로 분절된 DNA는 세포막의 투과성이 증가된 경우 세포밖으로 유출되므로 사멸세포내의 DNA양은 감소하게 되어, propidium iodide 등의 DNA 결합색소로 염색한 후 유세포 분석기로 관찰하면 사멸체의 DNA는  $G_1$ 기의 세포보다 적게된다 ("Sub- $G_1$  peak",  $A_0$  세포). 이때 세포밖으로 유출된 DNA의 양을 면역학적 방법으로 검출하면 사멸의 정도를 평가할 수 있다[5].

그러나 이온화방사선에 의해 유발되는 난포 퇴화에 관한 세포주기 분석 및 DNA 분절화 분석에 관한 연구는 현재까지 미진한 상태이다. 따라서 본 연구는  $\gamma$ -선에 의해 피폭된 생쥐 난소에 대한 세포주기 분석 및 세포자연사의 양상을 분석하기 위해 시행되었다.

## 재료 및 방법

한국화학연구소에서 분양받은 생후 3주된 생쥐(ICR, 체중  $10 \pm 1g$ )에 이온화방사선을 전신 조사하였다. 이온화방사선 조사는 한국원자력 연구소의 감마선 발생장치(cobalt 60, 약 1 kCi, Atomic Energy of Canada Ltd.)를 이용하였다. 이온화방사선원과 실험동물 사이의 거리를 106 cm로 일정하게 하고 6.94 rad/min의 선량율로  $LD_{80(30)}$ 이 되는 8.3 Gy로 방사선을 조사하였다. 이때의 조사선량은 Friche dosimeter로 측정하였다. 이온화방사선 조사 후 diethyl ether (Merck) 마취 하에 경추파괴로 생쥐를 도살한 후 난소를 적출하였다.

적출된 생쥐 난소를 10% NBF 용액에 12시간 고정한 후 저농도에서 고농도

ethyl alcohol 과정을 거쳐 탈수하였다. xylene으로 alcohol을 제거한 후 조직을 투명화하여 paraffin을 침투시켜 포매하였다. 조직의 이탈을 방지하기 위하여 poly-L-lysine(Sigma)을 slide에 도말한 후 건조시켰다. 박편절단기 (Microtome, Lipshow)를 사용하여 4 $\mu$ m로 박절한 후 핵과 세포질을 관찰하기 위하여 slide를 xylene에 넣어 paraffin을 제거한 후 alcohol 과정을 거쳐 물에 세척하였다.

Hematoxylin에 5분 동안 핵을 염색한 후, 1% HCl-alcohol에 탈색시키고, 흐르는 물에 10분 동안 방치하였다. 그 후 eosin으로 2분간 세포질을 염색한 후 alcohol 과정을 거쳐 탈수시켰으며, xylene에서 투명시킨 후 Canada balsam으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다.

세포자연사를 관찰하기 위해 검출 키트 (ApopTag; Oncor)를 사용하여 (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labelling, TUNEL) 방법에 의한 *in situ* 3'-end labeling을 실시하였다. 조직절편된 슬라이드를 xylene 과정을 거쳐 paraffin을 제거하였다. alcohol 과정을 거쳐 흐르는 물에 수세하고 proteinase K (20 $\mu$ g/ml)로 20분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 단백질을 제거한 다음 흐르는 물에 수세하였다. 난소 내에 존재하는 내재성 효소를 제거하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 5분 동안 반응시킨 후 흐르는 물에 5분 동안 세척하였다. 슬라이드를 PBS (pH 7.4)로 다시 세척한 후 ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 5분 동안 처리한 다음 TdT enzyme을 첨가시키고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 반응을 중단하기 위하여 stop buffer를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응 시키고 PBS로 3회 세척하였다. 그 후 anti-digoxigenin-peroxidase로 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척하고 DAB로 1분 동안 발색시켰다. 발색이 된 조직은 증류수로 세척한 다음 3% methyl green으로 2차 염색을 하였다. alcohol 과정을 거쳐 탈수하고, xylene으로 투명시킨 후 Canada balsam으로 봉입하였다.

각 실험군의 난소내 비특이적인 DNase 활성을 막기 위해 난소를 -70 $^{\circ}$ C의 저온냉동기에 급냉한 후 보관하였다. 시료의 DNA를 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol로 추출 후, 동량의 chloroform:isoamyl alcohol로 재추출하였다. 상층액을 모아서 0.1배 부피의 3M sodium acetate와 0 $^{\circ}$ C에 보관한 2.5배의 100% ethanol로 DNA를 침전시키고 적어도 60분 이상 -70 $^{\circ}$ C에서 방치하였다. 이것을 4 $^{\circ}$ C에서 14,000 $\times$ g로 30분간 원심분리한 후 0 $^{\circ}$ C에 보관된 80% ethanol 0.2ml로 세척하였다. Speed-Vac Concentrator (Savant Instruments)으로 15분간 진공하에서 건조시켜 DNA를 얻었다. 압축 결정물은 25 $\mu$ l의 멸균된 증류수에 녹이고, 260nm의 흡광도로 양을 측정한 다음 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 추출된 DNA를 lane당 5 $\mu$ g의 농도로 2.5% agarose gel에 loading하고, running buffer로는 TBE 용액을 사용하였으며, 50V에서 3시간 동안 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 확인하였다.

NBF에 고정된 생쥐난소를 alcohol 과정을 거쳐 탈수하고 xylene 과정을 거쳐 투명화시킨 다음 paraffin에 침투시켜 block을 만들고, paraffin block을 50 $\mu$ m 두께로 박편하여 centrifuge tube에 넣은 다음 Histo-Clear (DAKO)에 30분 동안 처리하여 paraffin을 제거하였다. paraffin을 제거한 후 무수 및 95% ethyl alcohol에 각각 20분씩 2회 처리한 후 80%, 70%, 50% ethyl alcohol의 순서대로 10분씩 처리하여 조직을 함수시켰다. DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, GIBCO)에 2회 (1.5시간) 부유시키고 미리 37 $^{\circ}$ C 수조에 넣어 따뜻하게 한 0.5% pepsin 용액 (pH

1.5, stock 용액: pepsin 200mg/PBS 40ml)을 2.5ml 첨가하여 37°C 항온기에서 수시로 흔들며 주며 30 분간 유지하였다. 균질혼합기로 잘 혼합한 후, 0.025% Pepstatin (Beringer-Manheim)을 1ml 첨가하여 다시 흔들며 주었다. 1,500rpm으로 10분간 침전시킨 후, DPBS로 10분씩 3회 원침 수세하였다. 원심관에 buffer를 0.5ml 이상 남긴 후, RNase 300 $\mu$ l를 첨가한 후 균질혼합기로 혼합하여 37°C에서 30분간 방치하였다. 53 $\mu$ m Nylon mesh로 여과한 후 hemocytometer로 세포수를 계측하여  $1 \times 10^6$ 개/ml의 세포가 되도록 하였다. propidium iodide 50 $\mu$ l/ml 첨가한 후 유세포측정기 [Flow cytometer, Coulter Epics Profile II (Hialeah FL)]로 측정하였다.

## 결 과

본 실험에서 DNA 분절화를 확인한 결과 이온화방사선 조사 후 6시간 후에 185, 370, 555 bp의 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이온화 방사선에 의해 조사된 난소내 과립세포의 세포주기를 유세포분석기로 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 세포자연사를 확인할 수 있는 세포주기인  $A_0$  주기는 이온화방사선을 조사받은 군에서 대조군에 비해 현저히 높은 값을 보여, 이온화방사선 조사 후 6시간내에 대조군에 비해 2배 이상의 증가를 나타내었다 (Fig. 3). 즉, 대조군에서  $A_0$ 는 6시간에 11.7%, 12시간 10.3%, 1일 15.0%, 2일 15.5%로 나타났으며, 이온화방사선 조사군의 경우, 6시간에는 30.0%, 12시간 25.0%, 1일 20.9%, 그리고 2일에는 17.7%로 나타났었다.

이온화방사선을 조사하고 6시간 후에 대조군의 H-E 염색을 기본으로 하여, DNA 분절화 현상 (TUNEL)을 관찰하여 Table 1에 요약하였다. 6시간 군에서 TUNEL 염색은 강하게 나타났으며, DNA 분절화 현상이 진행된 난포의 수가 현저히 증가하였다. 12시간 군의 H-E 염색의 결과를 보면, 거의 모든 난포의 과립세포에서 핵응축이 일어난 것이 관찰되었다. TUNEL 염색 역시 12시간 대조군보다는 현저히 증가하였으나 6시간 군의 경우에 비교할 때 감소되는 경향을 보였다. 1일 군의 H-E 염색에서 거의 모든 난포내 과립세포가 핵응축된 것이 관찰되었다. TUNEL은 거의 모든 난포에서 염색도를 나타내었다. 2일 군의 TUNEL 염색성은 대조군과 비슷하였으나 소난포에서는 거의 발현되지 않았다.

## 논 의

이온화방사선에 의한 난소내 난포의 퇴화가 apoptosis에 의한 것임을 보여주는 DNA 분절화 분석 결과 이온화 방사선에 의한 난포 퇴화는 세포자연사에 의해 일어나며, 특히 6시간 내에 방사선의 영향이 나타나 급성인 것을 알 수 있었다. TUNEL은 작은 조각으로 잘려진 DNA의 3'-말단에 결합함으로써 세포자연사가 일어난 세포에 염색된다. TUNEL 방법에 의해 조직절편내 세포자연사의 확인에 있어서도 6시간에 대조군에 비해 상당히 많은 난포가 퇴화되었으며, 따라서 TUNEL의 염색도도 진하게 나타났다.

난포퇴화는 세포주기를 결정하는 요인들과 상당히 밀접한 관계가 있다. 유세포 분석기를 통한 방사선 조사는 세포자연사가 일어나는  $A_0$  phase의 증가를 분명히 보여주었다. 배양세포에 비하여 paraffin 절편을 이용한 분석은 CV의 값이 배양세

포에 비해 약간 증가하였으며 조사 후 FSH 처리는 A<sub>0</sub> 세포의 6시간, 12시간에서 분명한 감소를 보여주었다.

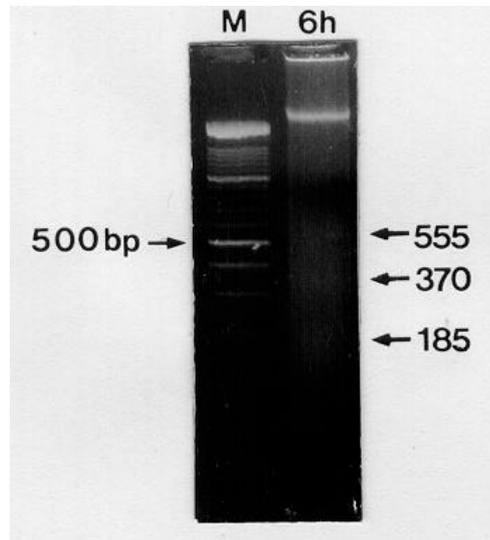


Fig. 1. DNA fragmentation analysis showing radiation - induced apoptosis at 6 hours post-irradiation.

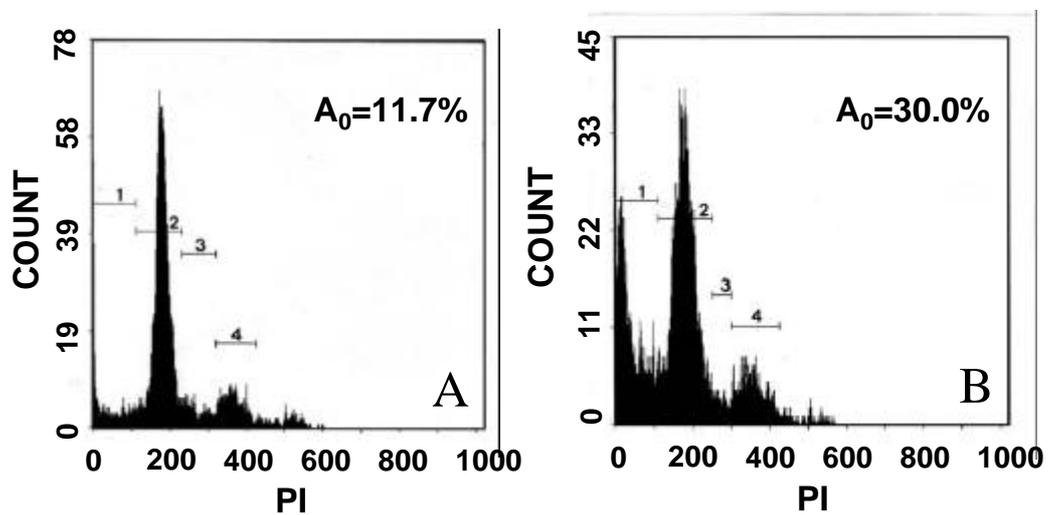


Fig. 2. Histograms of DNA extracted from granulosa cells of the immature mouse ovaries. Total DNA was extracted after 6 hours from the control (A) and the irradiated mouse ovarian granulosa cells (B). The percentage of granulosa cells containing sub-diploid amounts of DNA (% A<sub>0</sub> cells) and the distribution

of cells in the stage of the cell cycle were determined by DNA fluorescence flow cytometry of propidium iodide (PI)-stained nucleus of paraffin embedded cells. Total  $1 \times 10^6$  cells were counted with at least 5 times per the experimental group. Region 1 represent the portion of the granulosa cell population containing sub-diploid level of DNA (A0). Region 2, 3, and 4 represent G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, and G<sub>2</sub>/M stage of the cell cycle, respectively.

조류의 경우, ceramide의 처리나 혹은 UV radiation으로 과립세포의 apoptosis가 증가된다는 보고가 있다[6]. Guinea pig의 경우, estrus cycle의 초기에 이온화방사선 조사를 받은 경우에는 염색체 손상의 빈도가 낮으나, estrus cycle의 중간에 조사를 받은 경우의 난자는 난자내 염색체의 손상율이 높아져 수일내에 소멸된다[7].

Table 1. Immunohistochemical detection of apoptosis by TUNEL in the irradiated mouse ovary

	6h	12h	1d	2d
<b>Control</b>	+	+	+	+
<b>Irradiated</b>	+++	++	+	+

+++ very intensive; ++ intensive; + normal; - weak

흰쥐에서 이온화방사선 조사에 의해 뇌하수체 호르몬 분비세포에 손상을 입은 결과 FSH와 LH의 혈청내 농도가 감소하고, 이온화방사선 조사를 받은 양의 경우, 강소형성난포가 퇴화되며, 또 뇌하수체의 GTH 분비세포도 감소한다고 보고되었다 [8]. 이온화방사선을 조사한 경우에는 6시간부터 퇴화난포가 관찰되어 이후 증가되었으며 8일에는 성장하는 난포가 관찰되었다. 이온화방사선이 직접적으로 DNA에 손상을 주어 세포자멸사를 유도하는 것과, 세포막에 영향을 줌으로서 세포의 apoptosis를 증가시킬 것이라는 보고[9]를 볼 때, 이온화방사선에 전신노출되는 경우, 뇌하수체 호르몬의 분비감소와 함께 과립세포가 직접적으로 영향을 받음으로서 난포의 폐쇄가 유발되는 것으로 생각되나, 본 실험에서는 사춘기 이전의 미성숙 생쥐를 사용하였으므로 이온화방사선에 의하여 유발되는 난포의 퇴화가 뇌하수체호르몬의 분비감소에 의한 것이라는 점은 배제될 수 있다고 생각된다. 또한, 과립세포가 apoptosis됨으로서 난포의 퇴화가 진행된다는 것을 보여주는 185 bp 및 370 bp의 DNA 분절이 이온화방사선 조사군의 경우 6시간에 증가되는 것을 관찰함으로써, 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화 역시 apoptosis를 매개로 하여 일어난다는 것을 알 수 있었다.

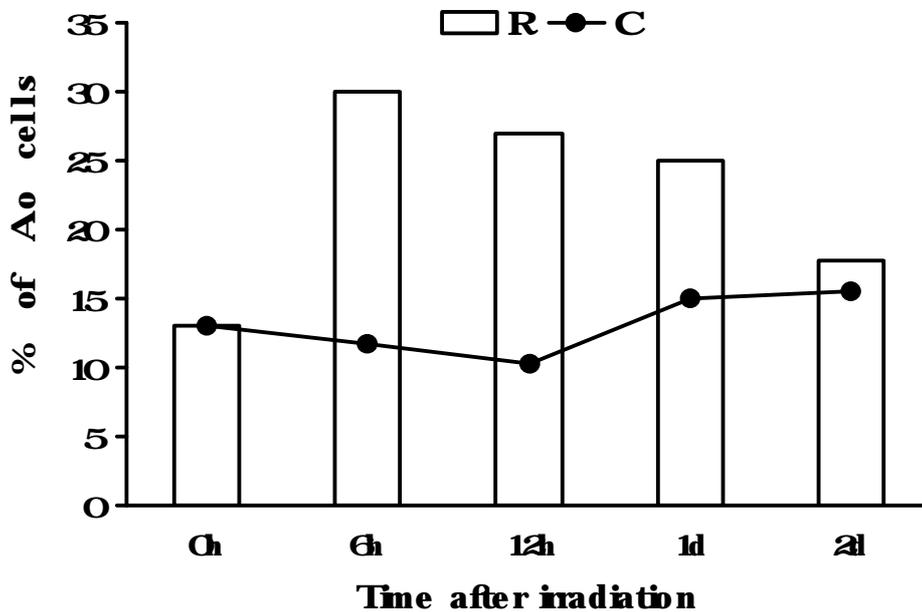


Fig. 3. Percentage of A<sub>0</sub> cells in the irradiated mouse ovary. Mice were irradiated and the ovaries were analysed by flowcytometer.

유세포분석에 의해 세포주기를 측정할 경우 dominant peak 및 이의 우측에 있는 작은 peak를 볼 수 있었다. 첫 번째 peak는 휴지기 (G<sub>0</sub>)와 DNA합성전기 (presynthetic phase: G<sub>1</sub>) 세포로서 DNA양은 2N이다. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peak 우측에 있는 작은 peak는 G<sub>2</sub>/M peak로 세포분열직전 (postsynthetic phase: G<sub>2</sub>) 에 있거나 세포분열을 하고 있는 세포에 해당하며 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>에 있는 세포의 두배의 DNA양과 염색체수 (4N)를 가지고 있는데, 이 둘은 유세포 측정법으로 분리할 수 없다. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>과 G<sub>2</sub>/M peak사이의 channel에 있는 세포들은 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>과 G<sub>2</sub>/M에 있는 세포의 중간정도의 DNA양을 갖고 있으며 DNA 합성 주기의 DNA 복제 또는 정지기 S 세포들이다 [10]. 본 실험의 결과 세포자연사를 확인할 수 있는 세포주기인 A<sub>0</sub> 주기는 이온화방사선을 조사받은 군에서는 현저히 높은 값을 보였다. 이는 이온화방사선에 의한 난포의 폐쇄가 apoptosis에 의해 매개된다는 결정적 증거의 하나로 생각된다.

### 결 론

이온화방사선에 조사된 생쥐 난소를 hematoxylin-eosin으로 염색하여 관찰한 결과 in situ 3'-end labeling에 의한 면역조직화학염색 결과와 일치되었다. 유세포분석과 DNA 분절화 분석을 통하여 이온화방사선에 의한 난포의 퇴화는 자연적인 난포퇴화와 마찬가지로 과립세포의 세포자연사를 매개로 하여 일어남을 확인하였으며, 이러한 난포의 퇴화는 이온화방사선에 의해 가속화된다는 결론을 얻었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음

## 참고문헌

1. Ramzy I. Effects of radiation and chemotherapy. In : Clinical Cytopathology and Aspiration Biopsy, Fundamental Principles and Practice, Appleton, Lange, Norwalk, Connecticut, 1990. pp107-116.
2. Dobson R. L. and Felton J. S. Female germ cell loss from radiation and chemical exposures. *Am. J. Indust. Med.* 1983. 4:175-190.
3. Lindop P. J. The effects of radiation on rodent and human ovaries. *Proc. Soc. Med.* 1969. 62:144-148.
4. Straume T., Dobson R. L., and Kwan T. C. Neutron RBEs and the radiosensitive target for mouse immature oocyte killing. *Radiat. Res.* 1987. 111:47-57.
5. Guthrie H. D., Welch G. R., Cooper B. S., Zakaria A. D. and Johnson L. A. Folw cytometry determination of degraded deoxyribonucleic acid in granulosa cell to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol. Reprod.* 1994. 50:1303-1311.
6. Witty J. P., Bridgham J. T. and Johnson A. L. Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. *Endocrinology* 1996. 137:5269-5277.
7. Jacquet P., de Saint-Georges L., Buset J., Baatout J., Vankerkom J. and Bagnnet-Mahieu L. Cytogenic effects of X-rays in the guinea pig female germ cells. II. The maturing oocytes. *Mut. Res.* 1997. 391:193-199.
8. Arendarcik J., Tokos M., Praslicka M. and Balun J. The effect of graduated radiation doses on the follicular apparatus of the ovaries and the adenohipophysis in sheep. *Vet. Med. (Praha.)* 1983. 28:597-604.
9. Haimovitz-Friendman A., Kan C. C., Ehleiter D., Perasud R. S., McLoughlin M., Fuks Z. and Kolesnick, R. N. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* 1994. 180:525-535.
10. Xiong Y., Zhang H. and Beach D. D-type cyclin associated with multiple protein kinase and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992. 71:505-514.