creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공학석사 학위논문

저선량 알파선에 대한 세포 반응의 선량률 효과 연구

Study on Alpha Particles Dose Rate Effect of Cellular Response in Low Dose Exposure

2020 년 2 월

서울대학교 대학원

에너지시스템공학부

이 동 현

저선량 알파선에 대한 세포 반응의 선량률 효과 연구

지도 교수 김 은 희

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함
2020 년 1월

서울대학교 대학원
에너지시스템공학부
이 동 현

이동현의 공학석사 학위논문을 인준함
2019 년 12월

위 원 장 정 경 재 (인)

부위원장 김 은 희 (인)

위 원 이 민 호 (인)

초 록

인체에 받는 피폭 중 알파선으로 인한 피폭은 주로 내부피폭에서 나타난다. 알파선 피폭으로 인한 생물학적 효과를 알아보기 위한 선행 연구로는 주로 역학조사와 극저선량 알파선 실험이 진행되어왔다. 저선량 알파선에 대한 in vitro 실험은 다른 종류의 방사선에 대한 실험에 비해 여전히 적으므로 알파선을 활용한 세포 반응 연구는 앞으로도 계속 진행되어야 할 필요가 있다. 본 연구에서는 저선량 알파선에 대한 세포 반응, 그리고 선량률의 영향을 알아보기 위한 in vitro 실험을 진행하였다. 또한, 알파선 조사 시에 LET(Linear Energy Transfer)에 변화를 주어 그에 따른 세포의 반응을 살펴보았다.

본 실험에서는 정상세포인 rat diencephalon cell과 종양세포인 rat gliosarcoma cell을 사용하였고, 서울대학교 방사선생명공학연구실의 알파선 조사 장치를 활용하여 다양한 선량률을 구현하여 실험을 진행하였다. 조사 조건으로 설정된 선량률은 0.05, 0.1, 0.5, 그리고 1 Gy/min이고 각각의 선량률에 따라 대조군을 포함하여 9가지의 다른 선량 조건으로 실험을 진행하였다. 조사된 세포들은 군집형성능 실험을 통해서 생존율을 확인하였다.

두 세포 모두 0.05와 0.1 Gy/min에 대한 저선량(< 0.2 Gy) 구간에서 대조군보다 더 많은 군집이 형성되었고 이를 호르메시스 효과라고 간주하였다. 0.5와 1 Gy/min의 저선량 구간에서는 호르메시스 효과가 관찰되지 않았고 세포 생존율 그래프의 형태가 선형 모델을 따랐다. 이에 대하여 선량률이 증가할수록 호르메시스 효과가 사라지는 것을 확인하였다. 또한, 0.5와 1 Gy/min에 대한 세포 생존율 그래프 기울기를 비교하였을 때, 0.5 Gy/min의 기울기가 더 가파르게 나타났다. 0.05와 0.1 Gy/min의 세포 생존율 그래프에서도 동일하게 0.05 Gy/min의 기울기가 더 가파르게 나타났다.

저선량 알파선에서 두 세포 모두 호르메시스 효과가 관찰된 이유는

저선량 알파선 피폭시 생성된 저농도의 Nitric Oxide로 인해서 세포 증식 능력이 증가하였기 때문이라고 추측하였다. 각각의 선량률에 대한 세포 생존율 그래프의 기울기 차이는 실험 조건으로 설정된 선량률 간의 LET의 차이로 인해 나타난 것으로 보고 LET에 대한 생물학적 효과비를 구하여 비교하였다. 생물학적 효과비는 LET에 대해 지수함수 형태로 증가한 뒤에 어느 지점 이후에는 다시 감소한다. 본 실험은 LET에 따른 생물학적 효과비가 최대값 이후 감소하는 구간에서 진행되었기 때문에 세포 생존율 그래프 간의 기울기 차이는 overkilling effect로 설명할 수 있다.

알파선 피폭의 인체 위해에 대한 대중의 관심은 날로 높아져가고 있음에도 저선량 알파선 피폭에 대한 연구가 많지 않다. 알파선과 같은 고LET 방사선 피폭시 세포 생존 곡선이 선형관계를 따를 것이라는 기존 모델이 이의 없이 받아들여졌기 때문이다. 본 연구는 기존 모델이 in vitro 실험결과와 일치하는지 확인하고자 진행되었고, 실험결과가 기존 모델과 다소 차이를 보이는 것을 확인하였다. 즉, 저선량 알파선 피폭시 세포 생존 곡선은 선형 관계를 따르지 않는 결과를 보였다. 이번 연구에서 확인된 저선량률 in vitro 실험에서 호르메시스가 관찰된 현상은 알파선 피폭시 위험도 평가에 관한 후속 연구에서 고려되어야 한다. 또한, 더 많은 조사 조건의 실험이 진행된다면 더 구체적인 반응을 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

주요어: 저선량, 알파선, 호르메시스, LET, 생물학적 효과비, overkilling effect

학 번 : 2018-28554

목 차

제 1 장 서 론 1

제 1 절 연구의 배경 1

제 2 절 연구의 내용 2

제 2 장 배경이론 3

제 1 절 RBE와 LET의 관계 3

제 2 절 Overkill effect 6

제 3 절 Linear Quadratic Model 7

제 4 절 과민감성(Hyper-radiosensitivity) 효과 8

제 5 절 호르메시스(Hormesis) 효과 12

제 3 장 대상 및 방법 15

제 1 절 세포 배양 방법 15

제 2 절 조사방법 16

제 3 절 세포 군집형성능 실험 (Clonogenic assay) 19

제 4 장 실험 결과 및 분석 22

제 1 절 호르메시스 효과 확인 22

제 2 절 세포 생존율 곡선의 기울기 비교 28

제 5 장 논 의 30

제 1 절 호르메시스 효과에 대한 해석 30

제 2 절 Overkill effect로 인한 세포 생존율 그래프의 기울기 변화 .32

제 6 장 결 론 35

참고문헌 37

Abstract 40

표 목차

Table 3.1. 실험의 조사 조건 18

그림 목차

Fig. 2.1. 포유류 동물의 세포에서 일어나는 DNA 손상 및 치사 손상에 따른 RBE와 LET의 관계 그래프 5
Fig. 2.2. IR Model (실선)과 LQ Model(점선)을 근거한 세포 생존율 그래프 비교.....10
Fig. 2.3. ATM(Ataxia Telangiectasia Mutated) 단백질의 활성화로 인해 HRS/IRR 현상이 나타나는 과정.....11
Fig. 2.4. 저선량 구간에서의 호르메시스 효과로 인한 세포 생존율에 대한 그래프 14
Fig. 3.1. 서울대학교 원자핵공학과 방사선생명공학연구실에 있는 알파선 선원 장치 17
Fig. 3.2. 본 실험에 진행된 세포 군집형성능 실험을 단계적으로 보여주는 그림.....21
Fig. 4.1. Rat diencephalon cell의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min에 대한 세포 생존율 그래프 24
Fig. 4.2. Rat gliosarcoma cell의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min에 대한 세포 생존율 그래프.....25
Fig. 4.3. Rat diencephalon cell의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min에 대한 변형된 식을 활용한 그래프.....26
Fig. 4.4. Rat gliosarcoma cell의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min에 대한 변형된 식을 활용한 그래프 27

Fig. 4.5. Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell의 생존율 그래프 기울기 비교 29
Fig. 5.1. 0.5와 1 Gy/min에 대한 세포 투과 전후의 알파선 에너지 스펙트럼 33
Fig. 5.2. 3가지의 물질에 전달되는 알파선 에너지에 따른 LET값을 나타내는 그래프 34

제 1 장 서 론

제 1 절 연구의 배경

알파선은 주로 인체에 호흡 또는 섭취에 의한 내부피폭을 통해 영향을 끼친다. 현재까지 알파선에 의한 생물학적 반응과 내부피폭시의 암 위험도를 확인하기 위해 많은 연구가 진행되어왔지만 대부분 역학조사와 자연방사선 조건과 유사한 극저선량 구간에 대한 실험이 진행되어왔다. 그러나 역학조사를 통하여 정확한 결론을 내리기에는 한계가 있어 동물이나 세포를 사용하여 저선량 구간에 대한 생물학적 반응을 관찰해왔다. 하지만 저선량 알파선에 대한 실험은 많지 않았다.

세포를 사용한 in vitro 실험은 기술이 발전함에 따라 데이터에 대한 정확도와 신뢰도가 올라갔다. Puck과 Marcus에 의해 세포 배양 및 군집형성능 실험(Clonogenic Assay)이 설립되었고 [1], 그 이후 기술의 발전으로 Durand가 제시한 유동세포계수법을 통해 세포의 방사선 민감성에 대한 실험이 더 정확하게 진행될 수 있었다 [2]. 그로 인해서 저선량 구간에서 세포 반응에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 하지만 대부분의 in vitro 실험에서는 X선 또는 감마선이 사용되었고 알파선을 사용한 실험 데이터는 극히 드물었다.

Thomas et al.은 저선량 구간에서 보이는 과민감성(Hyper radiosensitivity, HRS) 현상에 대한 대표적인 실험 자료들을 표로 정리하였는데 알파선으로 진행된 실험은 하나만 기재되어있었다 [3]. HRS 현상은 저선량 구간에서 세포 생존율이 Linear Quadratic(LQ) 모델을 따르지 않고 급격하게 줄어드는 현상이다. 알파선과 같은 고LET 방사선에 대한 세포 생존율 그래프는 선형 모델을 따르는 것이 일반적인데 HRS 현상으로 인해 다른 곡선 형태를 보였다. 따라서 이것에 대해 실험을 통해 확인할 필요가 생겼다. 또한, 알파선 피폭시 나타나는 생물학적 현상에 대한 연구는 역학조사와 극저선량 구간에

대한 실험으로 주로 진행 진행되어왔기에 본 연구는 in vitro 실험을 진행하여 저선량 알파선의 세포 반응에 대해 알아보았다. 추가적으로 본 실험에서는 선량률을 다양하게 설정하여 선량률에 대한 효과도 함께 알아보았다.

제 2 절 연구의 내용

본 실험은 Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell을 사용하여 저선량 알파선에서 선량률이 어떻게 세포 반응에 영향을 끼치는지 알아보기 위해 진행하였다. 두 세포의 알파선에 대한 세포 생존율 그래프를 그리기 위해 군집형 성능 분석을 진행하였고 저선량 알파선의 세포 반응을 중요시 하였기에 저선량 구간에서 선량 조건을 세세하게 나누어 조사하였다. 저선량 구간에서의 세포 생존율을 비교하여 세포 반응에 대해서 알아보았고, 이때 나타난 반응을 좀 더 정확하게 확인하고자 세포 생존율 그래프 fitting에 사용된 LQ 모델을 변형시켜 활용하였다. 실험을 통해 확인된 세포 반응이 선량률에 따라 어떻게 나타나는지 알아보기 위해 선량률을 다양하게 하여 세포 생존율 그래프를 그려보았다. 마지막으로 선량률 조건을 구현하기 위해 사용된 방법에 따른 LET의 차이가 본 실험에서 어떤 영향을 끼쳤는지 알아보기 위해 각각의 선량률의 LET값을 구하고 그에 따른 RBE값을 구하여 비교하였다.

제 2 장 배경 이론

제 1 절 RBE와 LET의 관계

상대적 생물학적 효과비(Relative biological effectiveness, RBE)는 방사선 치료에 있어서 중요한 수치로써 기준방사선과 동일한 생물학적 반응을 유발하는데 요구되는 비교방사선의 상대 선량 비를 나타낸다. 기준방사선은 일반적으로 250 kV 엑스선 또는 ^{60}Co 감마선을 사용하고 있다. 생물학적 반응으로는 세포 사멸, DNA 손상, 염색체이상, 돌연변이 등이 있다.

선에너지전달밀도 (Linear Energy Transfer, LET)는 방사선이 표적 물질에 전달하는 단위 거리 당 에너지 밀도를 뜻한다. 정확한 기준은 정의되어 있지 않지만 일반적으로 10 keV/μm 이하의 LET를 저LET라고 지칭한다. 저LET 방사선으로는 감마선과 베타선 등이 있고, 고LET 방사선으로는 알파선과 중성자가 있다. 고LET 방사선에 의해 나타나는 DNA 손상의 형태는 복잡하기 때문에 세포가 자체적으로 회복하기 어렵다 [4]. 이로 인해 생물학적 반응들이 고LET 방사선에서 일어날 확률이 높기 때문에 RBE 값이 높게 측정 된다. RBE의 값에 대한 범위는 관찰하고자 하는 생물학적 반응, 방사선 종류, 세포계에 따라 다양하게 측정된다 [5].

방사선 민감도가 높은 세포에 대해서는 LET가 증가함에 따라 RBE가 증가하는 정도가 보통세포에 비해 낮다. 이는 저LET와 고LET의 방사선에 의한 세포 손상도가 비슷하고 저LET 방사선으로 인한 세포 손상의 회복 정도가 낮기 때문이다. 이를 통해 RBE와 LET의 관계는 저LET 방사선에 대한 보통세포의 회복 능력에 크게 의존한다는 것을 알 수 있다.

RBE의 값은 LET의 함수이므로 두 값의 관계에 대해 그래프로 나타낼 수 있다. Fig. 2.1은 알파선 피폭으로 인한 포유류 동물의 세포

손상에 대한 RBE와 LET의 관계를 보여주는 그래프이다. LET값이 100 keV/μm에 도달하기까지 RBE값이 증가하고 그 이후에는 감소하게 된다. RBE의 값이 최대치 이후에 감소하는 현상을 Overkill effect라고 한다.

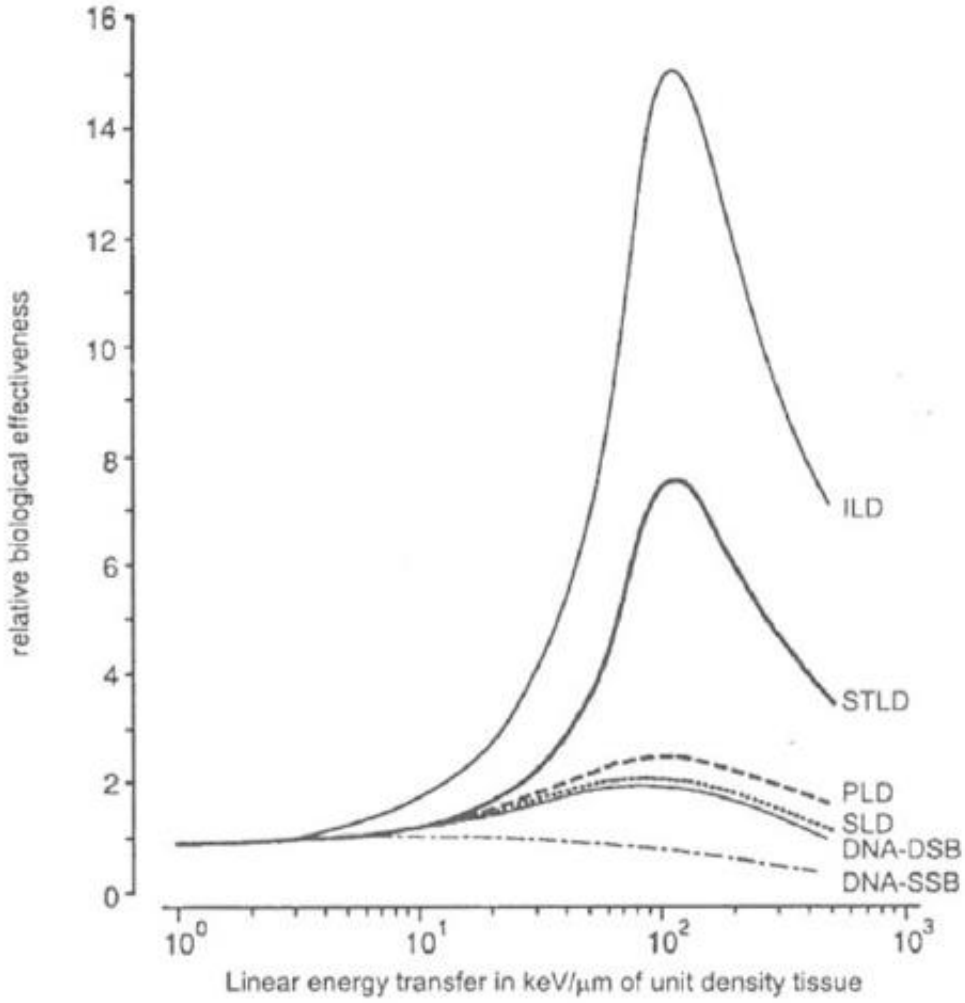

Fig. 2.1. 포유류 동물의 세포에서 일어나는 DNA 손상 및 치사 손상에 따른 RBE 와 LET 의 관계 그래프 (ILD: Irrepairable Lethal Damage, STLD: Single Track Lethal Damage, PLD: Potentially Lethal Damage, SLD: Sublethal Damage, DSB: Double Strand Break, SSD: Single Strand Break) [5].

제 2 절 Overkill effect

RBE와 LET의 관계를 나타내는 그래프 Fig. 2.1에서 100 keV/μm 이후의 구간에서 RBE가 감소하는 Overkill effect를 볼 수 있다. 이는 표적세포의 수가 제한되어 있는 경우, 표적세포를 죽음에 이르게 하는데 필요 이상의 에너지가 전달되어 나타나는 현상으로 설명 할 수 있다 [6]. 다르게 해석하면 RBE가 LET에 의해서 증가하는 구간에서는 세포 죽음이 효과적으로 나타나지만 overkill effect 구간에서는 비효율적으로 나타나게 된다 [7].

제 3 절 Linear Quadratic Model

Linear Quadratic Model은 저선량 구간에서 나타나는 세포 생존율의 그래프 모델 중에 가장 대표적으로 쓰이는 모델이다. LQ Model을 수식으로 표현했을 때는 다음과 같다.

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

SF = Surviving Fraction

D = Dose

α = linear coefficient

β = quadratic coefficient

α는 저선량 구간에서 곡선형태로 나타나는 그래프의 기울기를 나타내고 β는 고선량 구간에서 선형으로 나타나는 그래프의 기울기를 나타낸다. 또한, LET가 낮은 방사선에 노출된 세포의 생존율은 저선량 구간에서는 곡선의 형태로 감소하게 되고 선량이 증가할수록 생존율이 직선의 형태로 감소하는 것을 나타낸다. α와 β값은 세포계, 방사선 종류, 선량률에 따라 다르게 나타날 수 있다.

LET가 높은 방사선에 대한 세포 생존율 그래프에서는 β값이 0으로 나타나기 때문에 LQ Model의 식이 다음과 같은 선형 모델로 바뀌게 된다.

$$SF = \exp(-\alpha D)$$

제 4 절 과민감성(Hyper-radiosensitivity) 효과

과민감성 현상이란 저선량(<0.5Gy) 구간에서 세포 생존율이 LQ Model을 따르지 않고 급격히 줄어드는 현상을 말한다. 저선량 구간에서 HRS 현상을 통해 세포 생존율이 급격히 줄어든 뒤에는 선량이 증가함에 따라 다시 생존율이 회복하고 LQ Model을 따르게 된다. 이 때 HRS 현상 뒤에 생존율이 증가하는 현상을 IRR(Induced-Radioresistance)라고 부른다. IRR 현상은 저LET에서만 관찰된다 [8]. HRS/IRR 현상의 유무 또는 생존율 감소와 증가하는 정도는 세포계, 방사선의 종류, 선량률에 따라 다르게 나타난다. HRS 현상에 대한 세포 생존율 그래프를 LQ Model로 표현하기에는 한계점이 있어 새로운 모델이 도입되었다. 이를 Induced-Repair (IR) Model이라 부르고 수식은 다음과 같다.

$$\mathrm{SF} = \exp[-(\alpha_r(1 + ({}^{\alpha_s}/_{\alpha_r} - 1)\exp\left(-{}^{d}/_{d_c}\right))d - \beta_r d^2]$$

SF = Surviving Fraction

α_r = The initial slope of the survival curve extrapolated from the conventional high-dose response

α_s = The initial slope of the survival curve at very low doses

d = Dose

d_c = The dose that induced the change from HRS to IRR response

β_r = The distal slope of the survival curve

Fig. 2.2는 LQ Model과 IR Model의 세포 생존율 그래프 형태를 비교하여 나타낸다.

HRS 현상에 대한 메커니즘을 알아내기 위해 지난 몇 년 동안 연구가 활발하게 진행되어왔다. 몇몇의 연구진들은 세포 주기에 영향을 끼치는 단백질인 ATM(Ataxia Telangiectasia Mutated)이 활성화되는 선량 구간과 HRS 현상에서 IRR 현상으로 바뀌는 선량 구간이 일치하는 것을 토대로 메커니즘을 설명하고 있다. Fig. 2.3은 ATM의 활성화로 인해 HRS와 IRR 현상이 일어나는 과정을 단계별로 정리한 그림이다. 최근에는 DNA 회복과 연관된 단백질의 발현에 의한 HRS/IRR 현상으로 메커니즘을 제시하였다 [9].

또 다른 HRS 현상의 메커니즘에 대한 설명으로 세포자살(Apoptosis)이 있다. HRS 현상이 관찰된 세포에서만 세포자살이 저선량 구간에서 관찰되면서 추가적인 실험이 계속 진행되었다 [10].

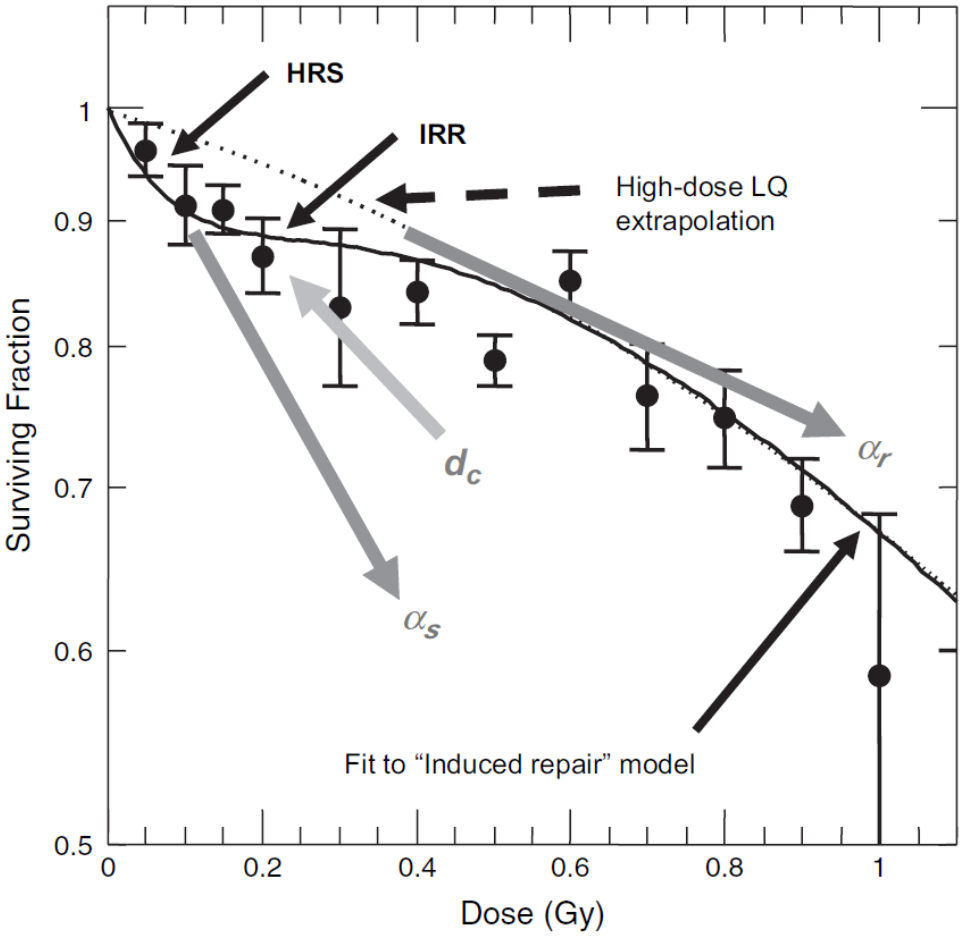

Fig. 2.2. IR Model (실선)과 LQ Model(점선)을 근거한 세포 생존율 그래프 비교 [8].

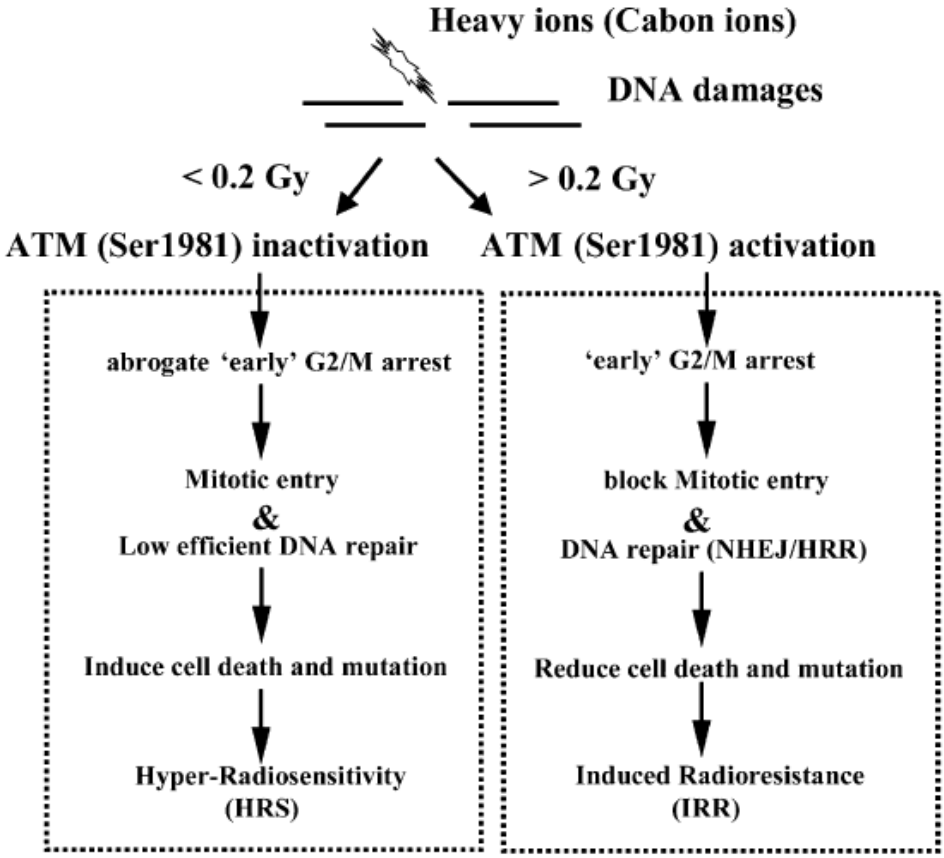

Fig. 2.3. ATM(Ataxia Telangiectasia Mutated) 단백질의 활성화로 인해 HRS/IRR 현상이 나타나는 과정 [9].

제 5 절 호르메시스(Hormesis) 효과

저선량 구간에서 나타나는 세포 반응 중에 하나인 호르메시스 효과는 독성학(toxicology)에서 주로 쓰이는 단어로써 저선량 자극으로 인해서 나타나는 이로운 효과 또는 고선량에 대한 저항성이 높아지는 이상성 선량 효과를 정의한다 [11]. 호르메시스 효과는 적응효과인 adaptive response와 연관지어 설명하는 경우가 많다. Adaptive response는 낮은 세기의 자극으로 인해서 더 큰 자극에 대한 저항성이 커지는 효과를 나타낸다.

현재 일반적으로 방사선의 위험도를 나타내는 그래프 모델로는 Linear Non Threshold (LNT) Model을 사용하고 있다. LNT Model은 방사선 선량과 위험도 관계가 선형 비례한다는 것을 나타내는 그래프 모델이다. 하지만 방사선에 대한 호르메시스 효과를 지지하는 연구자들은 저선량의 방사선은 면역 체계를 활성화하여 이로운 효과를 주며 수많은 역학자료들을 제시하며 LNT Model을 반박하고 있다 [12]. 그리고 호르메시스 효과는 세균, 식물, 곤충, 무척추동물, 포유류동물에서도 나타나는 현상이라고 주장하고있다 [12]. Fig. 2.4는 저선량 구간에서 호르메시스 효과로 인해 세포 손상에 대한 반응 정도를 나타낸 것이다. Fig. 2.4를 살펴보면 저선량 구간에서 호르메시스 효과로 인해서 세포 생존율이 대조군보다 더 많이 살아남아 그래프가 control level보다 더 올라간 상태를 볼 수 있다.

현재까지도 방사선에 대한 호르메시스 효과의 유무를 가지고 논쟁은 계속되고 있다. 2005년 프랑스의 두 학술지인 the French Academy of Science와 the French National Academy of Medicine은 저선량 방사선에 의한 호르메시스 효과를 인정하였다 [13]. 그 당시 유럽국가 중 호르메시스 효과를 인정한 나라로는 프랑스가 유일했다. 그 외에 일본과 중국에서도 저선량 방사선의 이로운 효과를 뒷받침하는 역학자료들을 내세우며 호르메시스 연구에 힘을 실었다. 하지만 미국의 Biological Effect of Ioniziong Radiation (BEIR)과 National Committee

for Radiation Protection (NCRP) 위원회에서는 모든 선량의 방사선은 유해하다 하고 호르메시스 효과는 받아들이지 않았다 [12].

저선량 방사선에 의한 세포 반응으로 나타나는 호르메시스 효과에 관해서 아직까지는 정확한 메커니즘이 밝혀지지 않았다.

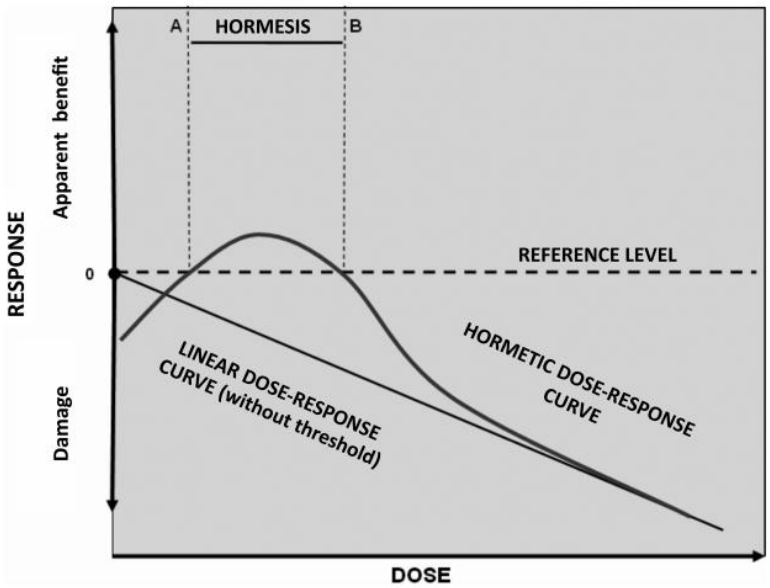

Fig. 2.4. 저선량 구간에서의 호르메시스 효과로 인한 세포 생존율에 대한 그래프 [14].

제 3 장 대상 및 방법

제 1 절 세포 및 세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 쥐의 정상 간뇌 세포인 Rat normal diencephalon cell(DI TNC 1, CRL-2005, ATCC)과 신경교육종 세포인 Rat gliosarcoma cell(9L/lacz, CRL-2200, ATCC)이다. 두 세포의 배지의 경우 90% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)과 10% Fetal Bovine Serum (FBS, ATCC)를 혼합하여 사용하였다. 또한 배양 조건은 37℃의 온도에서 10%의 CO_2를 incubator에 설정하여 배양하였다.

제 2 절 방사선 조사

본 실험에서 알파선을 조사하기 위해서 사용된 장치는 서울대학교 원자핵공학과 방사선생명공학연구실에 있는 알파선 선원 장치(SNU-ALPHACELL)를 사용하였다 [15]. 알파선 선원으로는 Activity가 10배 차이 나는 두 개의 Am-241(AFR-241 series, Eckert & Ziegler, USA)을 사용하였다. 각각의 선원의 Activity는 3.793과 0.371.1 MBq이다. 실험의 조사 조건으로 설정된 선량률은 0.05, 0.1, 0.5, 그리고 1 Gy/min으로 총 4가지의 다른 선량률로 진행하였다. 각각의 선량률에 따라 백그라운드를 포함하여 9가지의 다른 선량 조건을 설정하였다. 0.5 Gy/min과 1 Gy/min의 경우 선량 범위를 0 – 2 Gy로 하였고 0.05 Gy/min과 0.1 Gy/min의 경우 0 - 1 Gy의 선량 범위에서 실험을 진행하였다.

실험에 사용된 1 Gy/min 선량률의 경우 선원 위에 Mylar film을 두 장을 덮어 에너지 스펙트럼을 낮추면서 LET를 증가시켜 세포에 전달되는 평균 선량을 높였다. 같은 조건의 상태에서 선원만 교체하여 0.1 Gy/min 선량률을 구현하였다. Table 3.1은 실험 조건을 정리해놓은 표이다.

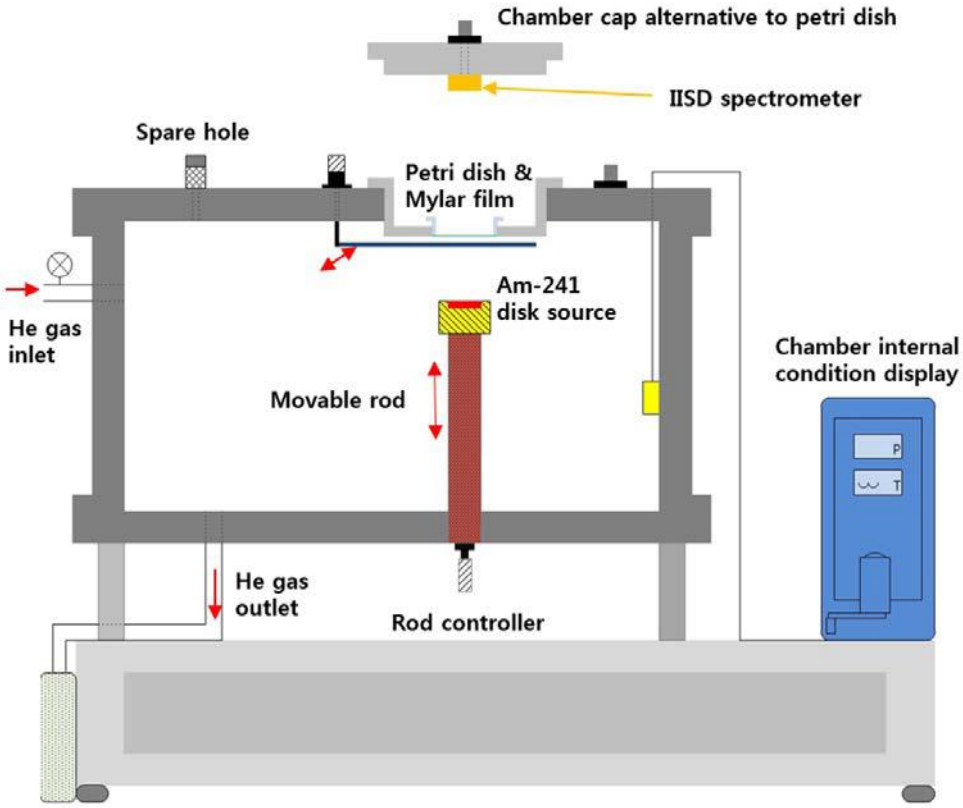

Fig 3.1. 서울대학교 원자핵공학과 방사선생명공학연구실에 있는 알파선 선원 장치(SNU-ALPHACELL)의 도식 [15].

Table 3.1. 실험의 조사 조건

선량률 (Gy/min)	선량 범위 (Gy)	STD (cm)	Mylar film for source attenuation (pieces)	LET (kev/μm)	Activity (MBq)
0.05	0 – 1	2.43	0	110	3.71
0.1	0 – 1	2	2	140	0.3
0.5	0 – 2	2.43	0	110	3.71
1	0 – 2	2	2	140	0.3

제 3 절 세포 군집형성능 실험 (Clonogenic assay)

방사선에 대한 세포의 생존율을 구하기 위해서 세포 군집형성능 실험을 진행하였다. 세포 군집형성능 실험은 단일 세포가 군집으로 자라나는 증식 능력을 관찰하는 실험이다. 최소 50개 이상의 세포로 군집이 형성되는 것은 세포가 방사선으로부터 생존한 것으로 간주한다. 아무런 조치를 하지 않은 대조군(control group)의 세포들도 seeding한 뒤에 모두 살아남아 군집을 형성하는 것은 아니다. 그러므로 대조군에서 생성된 군집의 수를 측정하여 Plating efficiency(PE)를 구하고 이를 다른 선량 조건의 보정 값으로 사용한다. PE 값을 활용하여 Surviving fraction(SF)의 값을 구할 수 있다. PE와 SF를 구하는 식은 다음과 같다.

$$PE = \frac{no.of\ \ colonies\ \ formed}{\text{no. of cells seeded}} * 100\%$$

$$SF = \frac{no.of\ \ colonies\ \ formed\ \ after\ \ treatment}{\text{no. of cells seeded} * \text{PE}}$$

세포 군집형성능 실험 진행 과정은 크게 두 가지로 나뉜다. 먼저 세포를 방사선에 노출시킨 뒤에 seeding을 하는 after treatment와 방사선에 노출 시키기 전에 seeding을 하는 before treatment가 있다. 본 실험에서는 Mylar dish에 세포를 배양한 뒤에 알파선 조사를 진행하고 6-well cell dish에 seeding을 했기에 after treatment 실험 과정으로 진행하였다.

먼저 25 T-Flask에 배양된 세포를 Trypsin을 사용하여 바닥에서 떼어낸 후에 9개의 Mylar dish에 30만개씩 seeding하였다. 세포 수를 셀 때에는 유세포분석(flow cytometry) 측정 방식을 사용하는 Muse™ cell analyzer을 사용하였다. Mylar dish에 옮겨진 세포는 바닥에 붙을 수 있도록 인큐베이터에 24시간 보관한 뒤에 알파선 조사를 진행하였다.

조사된 세포들은 바로 6-well cell dish에 seeding 하였고 인큐베이터에 10일 동안 보관하며 3일에 한 번씩 배지를 교체하였다. 10일이 지난 뒤에는 에탄올을 사용하여 세포들이 더 이상 증식하지 못 하도록 고정(Fixation)시키고 5% Giemsa(Sigma-Aldrich) 용액으로 염색하였다. 염색된 군집의 개수를 측정하고 PE, SF 식에 대입하여 세포 생존율 그래프를 그렸다. 각각의 선량 조건에 따라 실험을 최소 3회에서 최대 14회까지 실험을 반복하여 진행하였다.

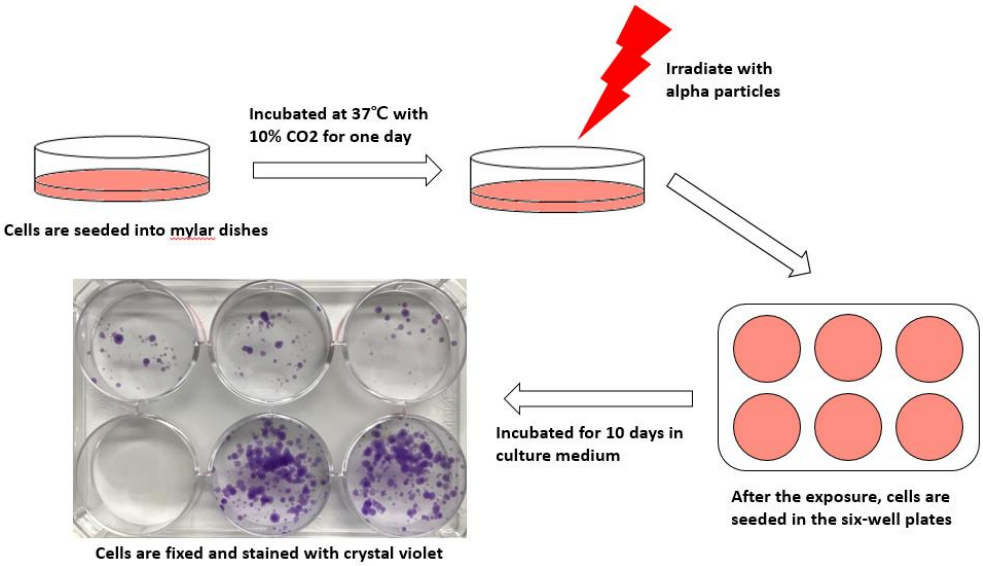

Fig. 3.2. 본 실험에 진행된 세포 군집형성능 실험을 단계적으로 보여주는 그림.

제 4 장 결과 및 분석

제 1 절 호르메시스 효과 확인

Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell을 대상으로 0.05, 0.1, 0.5, 1 Gy/min의 선량률로 조사한 이후 군집형성능 실험을 진행하였다. Fig. 4.1과 Fig. 4.2는 각각의 선량률에 대한 두 세포의 군집형성능 실험 결과이며 선형 모델에 근거하여 fitting한 그래프들이다. Fig. 4.1 (a)와 (b)의 저선량(<0.1 Gy) 구간에서 생성된 군집의 수가 대조군에서 생성된 군집의 수보다 더 많은 것으로 확인되었다. Fig. 4.2 (a)와 (b)에서도 동일한 경향이 0.2 Gy 이하 구간에서 관찰되었다. 저선량 구간에서 나타난 이러한 경향의 정도가 Rat gliosarcoma cell에서 더 뚜렷하게 나타났다. 이러한 반응 결과는 호르메시스 효과에 의한 것으로 간주하였다. 0.5와 1 Gy/min의 선량률부터는 호르메시스가 뚜렷하게 관찰되지 않았고 선형 모델을 따랐다.

호르메시스의 반응 유무를 뚜렷하게 확인하기 위해서 LQ Model의 식을 변형시켜 활용하였다. 알파선에 대한 LQ Model에서 α값을 표현하는 식으로 변형시켰다. 변형된 식은 다음과 같다.

$$-[\ln(SF_i)]/D_i = \kappa_i$$

각각의 선량조건에 대한 α값은 다르게 나타나기 때문에 위의 식에서는 κ_i로 표현하였다. 선량률에 따라 진행된 군집형성능 실험에 대한 데이터 값을 LQ 모델에 fitting하였을 때 나오는 기울기를 α값으로 한다. α와 κ_i값을 저선량 구간에서 비교하였을 때 해석할 수 있는 내용은 다음과 같다.

$\kappa \simeq \alpha$: Data fits to the standard curve $\mathrm{SF(D)} = \exp(-\alpha \mathrm{D})$

$\kappa < \alpha$: Hormesis

$\kappa > \alpha$: HRS response

Fig. 4.3과 4.4는 변형된 식을 활용하여 두 세포에 대해서 그린 그래프이다. 두 세포 모두 0.05와 0.1 Gy/min에 대한 저선량 구간에서 κ값들이 α값보다 작게 나타나고 선량이 증가함에 따라 α값에 가까워지는 형태를 보였다. 이를 통하여 저선량률에 대한 저선량 구간에서 호르메시스 반응이 관찰된 것을 확인하였다. 또한, 선량률이 증가함에 따라 저선량 구간에서 나타나는 호르메시스 반응의 정도가 감소하는 것도 관찰되었다.

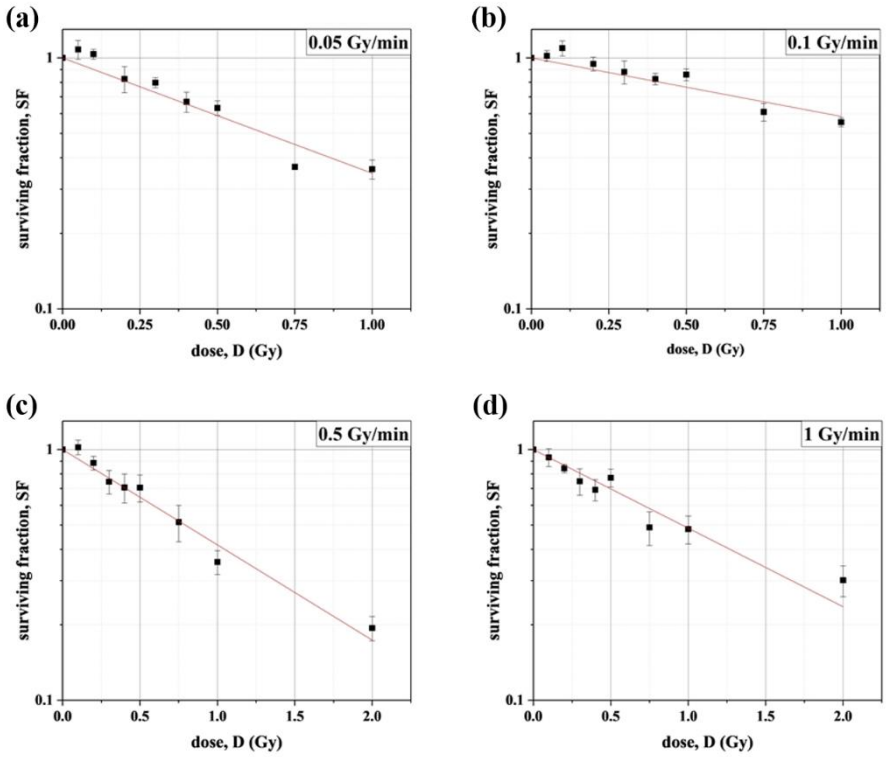

Fig. 4.1. Rat diencephalon cell 의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min 에 대한 세포 생존율 그래프.

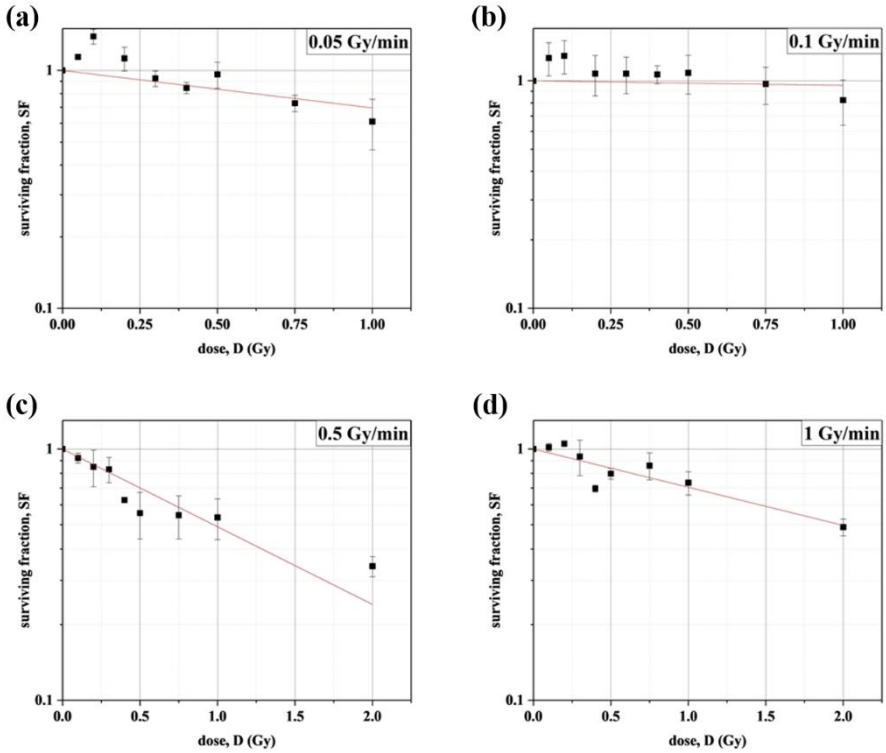

Fig. 4.2. Rat gliosarcoma cell 의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min 에 대한 세포 생존율 그래프.

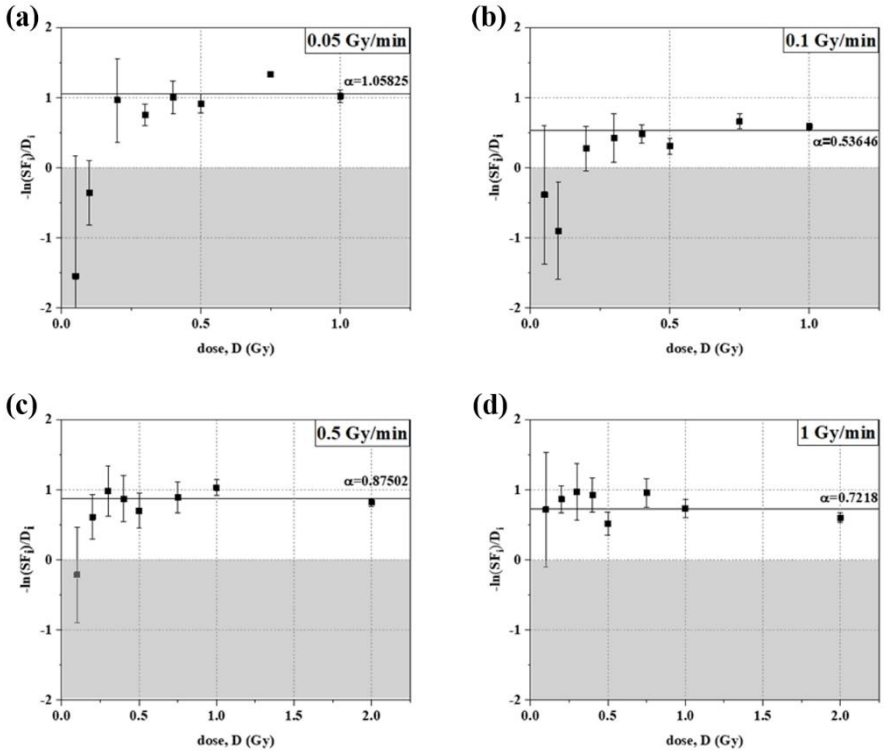

Fig. 4.3. Rat diencephalon cell 의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min 에 대한 변형된 식을 활용한 그래프. 이 때, 실선에 표기되어있는 α값은 세포 생존율 그래프의 기울기를 뜻함.

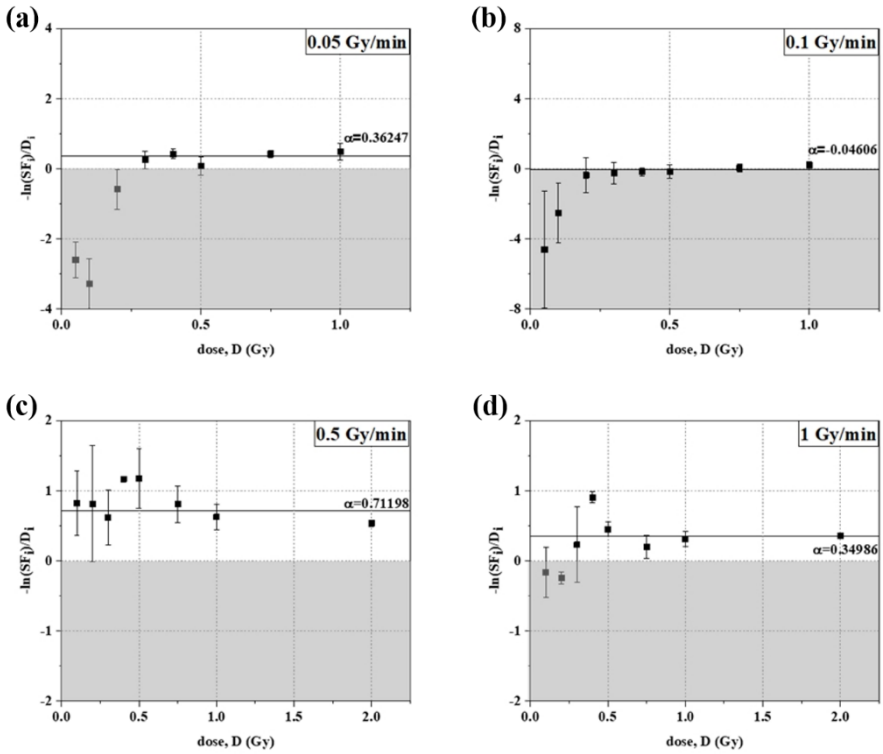

Fig. 4.4. Rat gliosarcoma cell 의 (a)0.05, (b)0.1, (c)0.5, (d)1 Gy/min 에 대한 변형된 식을 활용한 그래프. 이 때, 실선에 표기되어있는 α값은 세포 생존율 그래프의 기울기를 뜻함.

제 2 절 세포 생존율 곡선의 기울기 비교

Fig. 4.5는 Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell에 대한 생존율 그래프 기울기를 비교한 결과이다. 0.05와 0.1 Gy/min의 세포 생존율 그래프의 기울기를 비교하였을 때 0.05 Gy/min에서의 세포 생존 그래프 기울기가 더 가파르게 나타났다. 0.5와 1 Gy/min을 비교하였을 때도 같은 경향으로 나타났다. 이러한 경향은 두 세포에서 동일하게 나타났다. 선량률 효과 (Dose rate effect)에 따르면 선량률이 증가할수록 세포 생존 곡선 기울기가 더 가파르게 나타나는데 본 실험 결과를 비교하였을 때는 이와 반대되는 경향을 보였다.

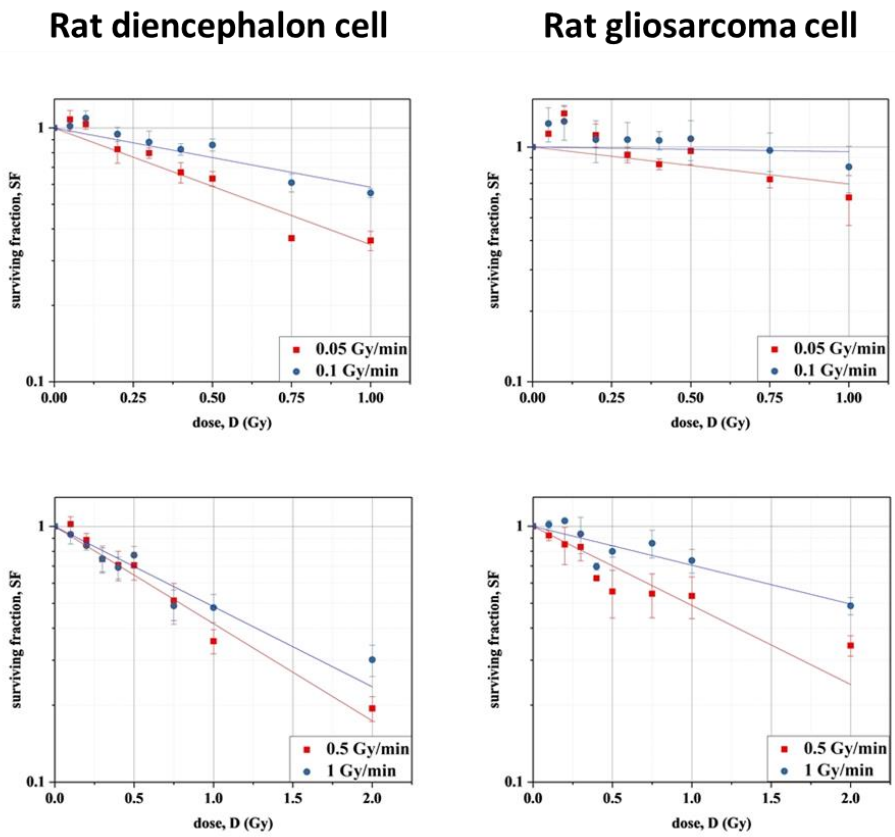

Fig. 4.5. Rat diencephalon cell 과 Rat gliosarcoma cell 의 생존율 그래프 기울기 비교.

제 5 장 논 의

제 1 절 호르메시스 효과에 대한 해석

저선량 구간에서 보이는 현상 중에 호르메시스는 adaptive response와 비슷한 개념으로 주로 독성학에서 쓰이는데 저선량 방사선에 의한 자극으로 인해서 세포 또는 생명체에 이로운 효과를 주는 현상이다. 이로운 효과로는 방사선에 대한 저항성이 높아지거나 세포 증식 활동이 더 활발하게 이루어지고 또는 다른 자극에 대한 저항성이 높아지는 효과가 있다. 호르메시스에 대한 연구는 대부분 역학조사를 통해서 주장되었다. 역학조사에 따르면 환경방사선이 평균보다 높은 지역에 거주하는 시민들의 암 발생률이 더 낮은 것을 확인할 수 있다 [12].

Calabrese et al.는 다양한 세포를 대상으로 다양한 독성에 대한 호르메시스 반응을 표로 정리하였다 [16]. 그 중에서는 NO(Nitric oxide)에 대한 호르메시스 반응을 확인한 연구가 있었는데 Sodium nitroprusside (SNP)를 NO(Nitric Oxide)의 공여체로 사용하여 0.1mM로 처리된 U937 cells에서 증식률이 45±2% 증가하였다. 그 이후 NO에 대한 농도가 증가할수록 증식률이 증가하는 효과는 점차 사라지고 세포 생존율이 감소하는 형태가 나타났다 [17].

다른 선행연구에서는 방사선에 노출된 세포에서 NO가 발생되는데 이를 구경꾼 (Bystander effect) 효과의 원인으로 설명한 바가 있다. NO는 소수성의 물질로 세포질과 원형질막에 잘 확산되며 세포 간의 신호 물질을 쉽게 전달한다 [18]. 저선량(<0.01Gy) 알파선 조사 시 세포 내에서 발생되는 NO로 인해서 세포 증식률이 증가하는 현상을 관찰하였다 [19]. 즉, 세포에 조사한 선량이 증가할수록 NO로 인한 세포 증식률이 감소하였다.

이를 통해서 본 실험에서 두 세포에 대하여 저선량의 알파선을

조사하였을 때 NO가 발현되고 발현된 낮은 농도의 NO로 인해서 세포 증식 효과가 증대되어 호르메시스 효과가 나타난 것으로 유추하였다.

제 2 절 Overkill effect로 인한 세포 생존율 그래프의 기울기 변화

본 실험에서는 1 Gy/min의 선량률을 구현하기 위해서 선원 위에 Mylar film을 덮어 에너지 감쇠를 통하여 세포에 전달되는 평균 선량률을 증가시켜 구현하였다. 0.5 Gy/min 선량률에 대한 세포 생존율 그래프 기울기가 1 Gy/min보다 더 가파르게 나타난 이유를 1 Gy/min을 구현하는데 사용된 방법의 특이성에서 나타난 LET의 차이라고 생각하여 각각의 선량률에 대한 LET를 구하였다. AASI (Advanced Alpha spectrometric SImulation)을 사용하여 알파선 선원의 스펙트럼과 실험조건을 묘사하여 에너지 스펙트럼을 그려보았다. Fig 5.1은 AASI를 활용하여 그린 에너지 스펙트럼이다. 세포를 투과하기 전에 전달되는 에너지와 투과된 후의 에너지를 평균을 내어 세포에 전달되는 에너지를 측정하였다. 이를 통해서 0.5 Gy/min에 대한 에너지는 3.25 MeV였고 1 Gy/min에 대한 에너지는 2 MeV였다. 측정된 에너지를 Fig. 5.2 그래프를 통해서 LET값을 구하였는데 1G Gy/min일 때는 LET값이 대략 165 keV/μm였고 0.5 Gy/min일 때는 대략 118 keV/μm로 나타났다.

두 LET의 값은 RBE가 최대치로 나타나는 100 keV/μm이후의 값으로써 overkill effect가 나타나는 구간에 위치하였다. RBE값을 비교하였을 때 0.5 Gy/min에서의 RBE값이 1 Gy/min일 때 보다 더 컸다. 이를 통하여 3.25 MeV 알파선의 경우 상대적으로 낮은 정도의 overkilling으로 cell killing 효과가 증가하여 낮은 세포 생존율을 보인 것으로 해석되었다.

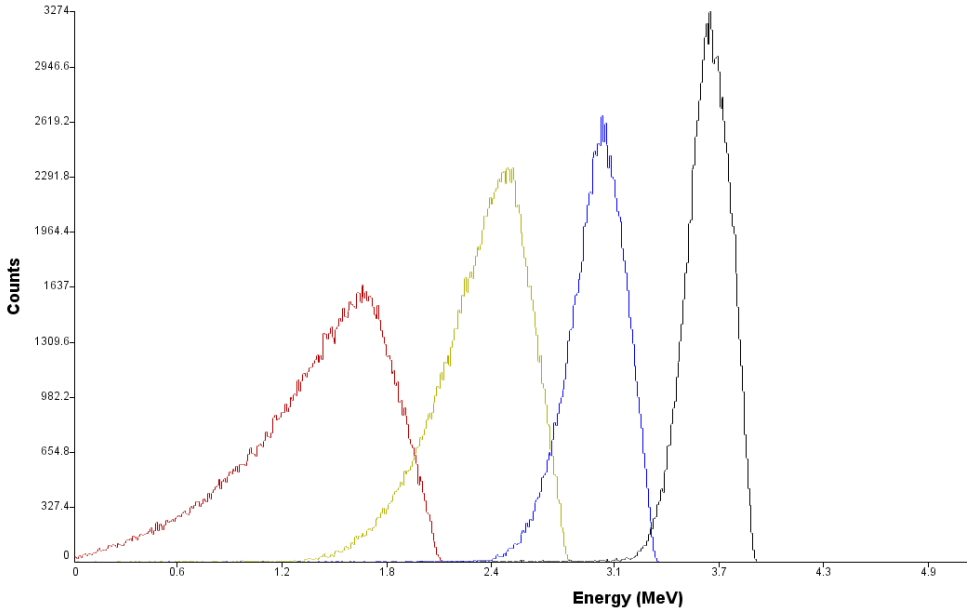

Fig. 5.1. 0.5 와 1 Gy/min 에 대한 세포 투과 전후의 알파선 에너지 스펙트럼. (왼쪽부터 1 Gy/min 세포 투과 후, 1 Gy/min 세포 투과 전, 0.5 Gy/min 세포 투과 후, 0.5 Gy/min 세포 투과 전)

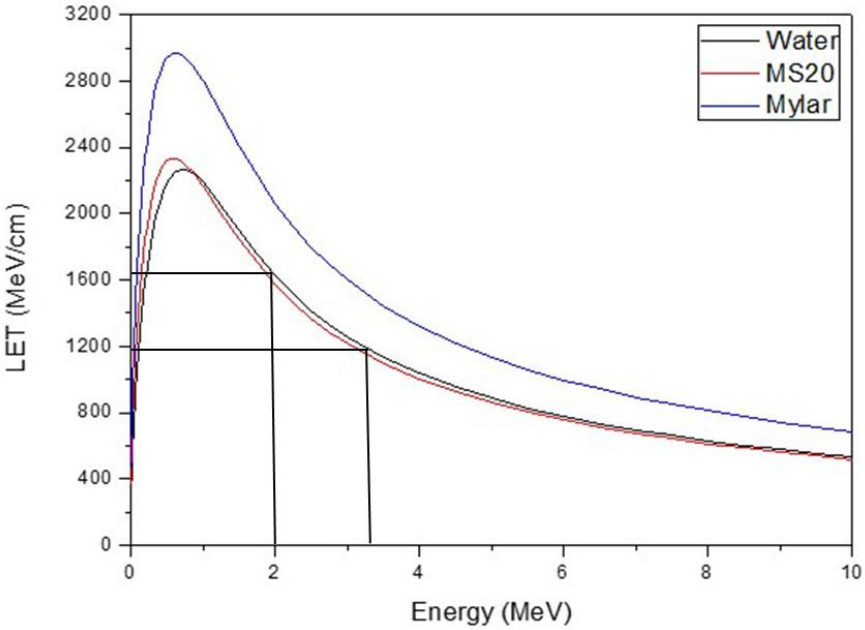

Fig. 5.2. 3가지의 물질에 전달되는 알파선 에너지에 따른 LET값을 나타내는 그래프. 두 실선이 만나는 점은 본 실험에 사용된 조건은 나타냄 [15].

제 6 장 결 론

알파선 피폭시 나타나는 생물학적 반응을 확인하기 위해서 많은 연구가 진행되어왔다. 하지만 대부분의 연구들은 역학자료에 의존해 왔고 저선량 알파선을 이용한 in vitro 실험은 많지 않았다. 따라서 본 연구에서는 저선량 알파선에 대한 세포 반응에 따른 선량률 효과를 알아보기 위해 in vitro 실험을 진행하였다.

Rat diencephalon cell과 gliosarcoma cell에 0.05, 0.1, 0.5 그리고 1 Gy/min의 알파선으로 조사하였다. 0.05와 0.1 Gy/min의 선량 범위는 0에서 1 Gy로 설정하였고, 0.5와 1 Gy/min의 선량 범위는 0에서 2 Gy로 설정하였다. 저선량 구간에서는 선량 조건을 세세하게 나누어 조사하였고, 두 세포에 대한 군집형성능 실험을 진행하였다. 두 세포 모두 0.05와 0.1 Gy/min의 저선량(<0.2 Gy) 구간에서 군집의 개수가 대조군보다 더 많이 관찰되었고 이러한 세포 반응을 더 정확하게 확인하기 위해서 알파선에 대한 세포 생존 곡선 fitting에 사용된 선형 모델 수식을 변형시켜 활용하였다. 이를 통하여 두 세포 모두 0.05와 0.1 Gy/min의 저선량 구간에서는 호르메시스 효과를 확인하였고, 0.5와 1 Gy/min의 저선량 구간에서는 세포 생존 곡선이 선형 모델을 따르는 것을 확인하였다. 호르메시스 효과가 관찰된 것은 저선량 알파선에 의해서 생성된 소량의 Nitric Oxide가 세포 증식 효과를 증대시켜 나타난 것으로 추측된다.

두 세포에 대한 생존 곡선 기울기를 비교하였을 때, 1 Gy/min보다 0.5 Gy/min이 더 가파르게 나타났고, 0.1 Gy/min보다 0.05 Gy/min이 더 가파르게 나타났다. 이는 선량률이 증가함에 따라 세포 생존 곡선 기울기가 가파르게 나타나는 dose-rate effect와 반대로 나타났다. 이러한 현상이 나타난 것은 0.1과 1 Gy/min의 선량률을 구현하기 위해 사용된 방법의 특이점에서 나온 것으로 판단하고 각각의 선량률에 대한 LET를 구하였다. 구한 LET값들은 생물학적효과비(RBE)가 최대치

이후에 감소하는 overkill effect 구간에 위치하였다. 이를 통하여 0.5와 0.05 Gy/min에서의 RBE값이 0.1과 1 Gy/min보다 더 크기 때문에 0.5와 0.05 Gy/min의 세포 생존 곡선 기울기가 더 가파르게 나타난 것으로 해석하였다.

본 연구는 저선량률의 알파선에 대한 저선량 구간에서 호르메시스 효과를 관찰하였고 이에 대하여 NO에 의한 세포 증식 효과 증대로 해석하였다. 호르메시스 효과로 인하여 본 실험을 통해 그린 세포 생존율 그래프는 기존에 알고있던 알파선과 같은 고LET 방사선에 대한 세포 생존율 그래프와 다른 형태의 생존 곡선을 보였다. 이러한 결과는 알파선에 의한 암 위험도에 관한 후속 연구에서 고려되어야 한다고 생각한다. 또한, 호르메시스 효과의 메커니즘에 관하여 연구를 계속할 필요가 있다고 생각한다.

참고 문헌

[1] Puck, T. T. & Marcus, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. The Journal of experimental medicine 103, 653-666, (1956).

[2] Durand, R. E. Use of a cell sorter for assays of cell clonogenicity. Cancer research 46, 2775-2778 (1986).

[3] Thomas, C. et al. Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR) response. International Journal of Radiation Biology 89, 813-822, (2013).

[4] Barendsen, G. W. Dose-Survival Curves of Human Cells in Tissue Culture Irradiated with Alpha-, Beta-, 20-KV. X- and 200-KV. X-Radiation. Nature 193, 1153, (1962).

[5] Franken, N. A. P. et al. Comparison of RBE values of high-LET α-particles for the induction of DNA-DSBs, chromosome aberrations and cell reproductive death. Radiation oncology 6, 64, (2011).

[6] Pouget, J.-P. & Mather, S. J. J. E. J. o. N. M. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. 28, 541-561, (2001).

[7] Bleddyn, E. A Simpler Energy Transfer Efficiency Model to Predict Relative Biological Effect (RBE) for Protons and Heavier Ions. Frontiers in Oncology 5, (2015).

[8] Marples, B. & Collis, S. J. Low-Dose Hyper-Radiosensitivity: Past, Present, and Future. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 70, 1310-1318, (2008).

[9] Xue, L. et al. ATM-Dependent Hyper-Radiosensitivity in Mammalian Cells Irradiated by Heavy Ions. International

Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 75, 235-243, (2009).

[10] Krueger, S. A., Wilson, G. D., Piasentin, E., Joiner, M. C. & Marples, B. The Effects of G2-Phase Enrichment and Checkpoint Abrogation on Low-Dose Hyper-Radiosensitivity. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 77, 1509-1517, (2010).

[11] Mattson, M. P. Hormesis defined. Ageing Research Reviews 7, 1-7, (2008).

[12] Luckey, T. D. Radiation Hormesis: The Good, the Bad, and the Ugly. Dose-Response 4, (2006).

[13] Tubiana, M. Dose–effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: The joint report of the Académie des Sciences (Paris) and of the Académie Nationale de Médecine. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 63, 317-319, (2005).

[14] Migliore, L., Rotini, A. & Thaller, M. C. Low Doses of Tetracycline Trigger the E. coli Growth: A Case of Hormetic Response. Dose-Response 11, (2013).

[15] Lee, K.-M., Lee, U.-S. & Kim, E.-H. A practical alpha particle irradiator for studying internal alpha particle exposure. (Report). Applied Radiation and Isotopes 115, 304, (2016).

[16] Calabrese, E. J. Cancer Biology and Hormesis: Human Tumor Cell Lines Commonly Display Hormetic (Biphasic) Dose Responses. Critical Reviews in Toxicology 35, 463-582, (2005).

[17] Jea, J. C., Liu, T. C., Wang, S. Y. & Sung, Y. J. Nitric oxide enhances the growth of U937 human leukemic cells through a cyclooxygenase-mediated pathway. Journal of Leukocyte

Biology 64, 451-458, (1998).

[18] Yakovlev, V. A. Role of nitric oxide in the radiation-induced bystander effect. Redox Biology 6, 396-400, (2015).

[19] Han, W., Chen, S., Yu, K. N. & Wu, L. Nitric oxide mediated DNA double strand breaks induced in proliferating bystander cells after α-particle irradiation. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 684, 81-89, (2010).

Abstract

Study on Alpha Particles Dose Rate Effect of Cellular Response in Low Dose Exposure

Donghyun Lee
Department of Energy Systems Engineering
The Graduate School
Seoul National University

Alpha particles exposure mainly occurs as an internal exposure on human body. Mostly, the epidemiological studies and in vitro studies with very low dose range have been proceeded to find the biological responses of alpha particles exposure. However, the number of in vitro studies using alpha particles are relatively low compared to the in vitro studies using other types of radiation. Therefore, the in vitro studies about cellular responses of alpha particles are necessary. In this study, the in vitro experiments were proceeded to find the cellular response on the low dose of alpha particles and the effect of dose rates on the cellular response. Also, the effect of LET on the cellular response was observed.

In this study, rat diencephalon cell and rat gliosarcoma cell were used as a normal and a tumor cell. The SNU-ALPHACELL that is built in Radbio Labatory at Seoul National University was used as the alpha particle irradiator. Both cells were irradiated with the alpha particles at the dose rates of 0.05, 0.1, 0.5, and 1 Gy/min. 9 different doses, including a control group (0 Gy), were set for the cell irradiation. Survival were measured by clonogenic assay.

Both cells formed more colonies than the control group in the low dose (<0.2 Gy) range at the dose rate of 0.05 and 0.1 Gy/min and considered this phenomenon to be a Hormesis. The hormesis was not observed at the dose rate of 0.5 and 1 Gy/min and the cell survival curve followed a linear model. Through with this results, it was confirmed that as the dose rate increased, the hormesis disappeared. Also, comparing the slopes of the cell survival curves at the dose rate of 0.5 and 1 Gy/min, the slope at the dose rate of 0.5 Gy/min was steeper. The same trend was shown from the slopes of cell survival curve at 0.05 and 0.1 Gy/min. Therefore, the slope at 0.05 Gy/min was steeper.

It was assumed that hormesis was observed due to the low concentration of nitric oxide produced during low dose alpha particles exposure. The previous study found that the low concentration of nitric oxide increases the cell proliferation. Also, it was assumed that the slope difference of the cell survival curve for each dose rate was due to the LET (Linear Energy Transfer) difference between dose rates set as experimental conditions. So the RBE (Relative Biological Effectiveness) was calculated by measuring the LET values from each dose rate. The RBE increases exponentially for the LET and then decreases at the certain point. Since this experiment was performed in the section where the RBE decreases after the maximum value, the slope difference between the cell survival curves can be explained by the overkilling effect.

Although the public interest in the hazards of alpha particle exposure is increasing day by day, there are not enough researches on low dose alpha particles exposure. This is because the fact that the cell survival curve of high LET radiation exposure, such as alpha particles, follows the linear model was accepted without objection.

However, the in vitro result in this study did not follow the existing model. The hormesis that was observed in this in vitro experiment should be considered in subsequent researches on the risk assessment of alpha particles exposure. Also, more accurate cellular responses can be identified by conducting more in vitro experiments with various dose conditions.

Keywords: low dose, alpha particles, Hormesis, LET, Relative Biological Effectiveness (RBE), overkilling effect

Student Number : 2018-28554