

인체의 암세포주와 치은섬유모세포주에서 방사선조사가 apoptosis 유발에 미치는 영향에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실 및 치학연구소

박무순 · 이삼선 · 최순철 · 박태원 · 유동수

목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 방법
- III. 연구성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

I. 서 론

대부분의 동물은 그들이 더 이상 필요로 하지 않거나 심한 자극을 제거할 목적으로 자신의 세포를 내인성으로 파괴시키는 과정을 실행시킬 수 있다. 이와 같은 예정된 세포사의 발현은 세포의 특징적인 형태학적 및 생화학적 변화를 수반하며 이러한 예정된 세포사의 현상을 apoptosis라고 부른다¹⁾. apoptosis의 발현은 정상이나 비정상적인 과정에서 조직의 형태와 모양을 조절하는 역할을 하고 세포의 복제와 세포사간의 평형을 유지함으로써 조직의 지속적인 재생과 항상성을 유지하게 된다²⁾. apoptosis가

일어나는 동안 핵과 세포질은 농축되고 분절되며 막에 둘러싸인 apoptotic body를 형성하는데 이러한 세포는 인접세포나 포식세포에 의하여 포식된다³⁾. apoptosis는 종종 nuclease의 활성화로 일어나서 초기에는 50-300 kilobase로 비교적 크게 분열되나 나중에는 매우 작은 oligonucleosomal fragment로 된다⁴⁾. 이에 반하여 세포괴사는 급성의 세포손상으로 일어나는 세포사로 세포가 빠르게 팽창되고 용해되어⁵⁻¹¹⁾ 세포질이 분비되고 이로 인하여 염증반응이 초래된다¹²⁻¹⁴⁾. 이러한 apoptotic cell death를 일으키는 과정에 이상을 초래하는 질병이 보고되고 있는데 백혈병이나 여러 암종, SLE (systemic lupus erythe matosus), 헤르페스바이러스감염 등에서는 apoptosis가 억제되고 후천성면역결핍증, 알츠하이머병 등에서는 apoptosis가 증가된다¹⁵⁻¹⁷⁾. 이밖에 성장호르몬이나 아연, 성호르몬 등은 apoptosis를 억제하고 TGF (transforming growth factor) β , 갈슘, 열, 종양억제제 (p53 등) 등은 apoptosis를 유발한다고 보고되었으며¹⁸⁻²¹⁾ 이온화방사선이나 여러 가지 항암제로 처리하였을 경우에도 몇몇 세포에서 apoptosis가 일어나는 것이 보고되었다²²⁻²⁵⁾. apoptosis를 비교적 초기에 알아낼 수 있는 방법으로는 유세포분석을 들 수 있으며 이에 관해서는 많은 연구가 있었다²⁶⁻³⁰⁾. 지금까지 apoptosis의 발생여부는 세포를 전자현미경으로 관찰하

*이 논문의 일부는 서울대학교 발전기금 일반 학술연구비(97-08-2107) 지원에 의해 이루어진 것임.
 접수일: 1998년 1월 15일
 채택일: 1998년 1월 30일

여 알 수 있었으나 위에서 언급한 바와 같이 생체 내에서 apoptotic 세포는 포식세포에 의하여 포식되므로 짧은 시간 동안만 존재하여 이를 정량분석하기가 불가능 하였다. 그러나 Darzynkiewicz 등²⁰⁾은 apoptotic cell은 DNA의 염색성의 감소로 인지될 수 있으며 DNA 발현을 나타내는 그래프 상에서 pre-G1 피크의 분석을 통해서 apoptotic cell의 DNA 용적의 정량분석도 가능하다고 보고하였다. 이에 저자는 DNA에 선택적으로 염색되는 색소인 propidium iodide(PI)로 염색 후 유세포분석기를 이용하여 DNA를 정량분석함으로써 세포 분열 및 성장주기에 따른 DNA의 양적변화를 측정하여 악구강영역의 암세포주(KB, RPMI 2650)와 정상세포주(HGF-1)에 방사선조사시 apoptosis가 발생하는가의 여부와 방사선양에 따른 apoptosis의 발생정도를 알아보고자 하였으며 사멸한 세포의 LDH (Lactate Dihydrogenase) 분석을 하여 괴사된 세포의 양을 확인하고자 하였다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

본 실험에서는 2 종의 인체 암세포주와 정상 치은섬유모세포주를 사용하였다. 암세포주는 한국세포주은행에서 분양받은 구강내 유포피암 종세포인 ATCC No. CCL17(KB)을 365-372 계대에서 사용하였고 인체의 비중격에서 발생한 분화도가 낮은 편평상피암종세포인 ATCC No. CCL30(RPMI 2650)을 32-36 계대에서 사용하였다. 정상 치은섬유모세포로는 28세 남자에서 얻어진 ATCC No. CRL 2014(HGF-1)를 9-12 계대에서 사용하였다.

배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM, Gibco, USA)에 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, USA) 10%와 Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA) 1%를 첨가하여 사용하였으며 기저면의 면적이 75 cm²인 T-75 플라스크를 배양용기로 사용하고 5% CO₂ 및 37°C 조건에서 배양하였다.

2. 방사선조사

apoptosis의 발생여부를 확인하기 위해 poly-lysine coated slides (Sigma, USA)에 각각의 세포를 배양하였으며 유세포분석을 위하여는 T-75 플라스크에 2x10⁶개의 세포를, LDH 분석을 위하여는 4 well dish에 5x10⁴개의 세포를 각각 넣어 배양하였다. 2일 후 각 plate가 60%의 세포밀도를 보이면 Cs-137 동물실험용 방사선 조사기(Mark type I, Shepherd, USA)를 사용하여 실온에서 선량을 241.5 cGy/min로 2, 10, 20 Gy를 각각 단일조사하였다.

3. Apoptosis 분석

가) Apoptosis 관찰

슬라이드에 각각의 세포를 배양하고 방사선조사 1일 후에 4% formaldehyde로 세포를 고정하고 Triton X-100으로 처리한 후 propidium iodide로 DNA를 염색하고 형광현미경으로 610nm에서 관찰하였다.

나) 유세포분석

방사선조사 1일 후 5x10⁴개의 세포를 1% methanol-free formaldehyde로 고정하고 70% ice-cold ethanol을 넣고 -20°C에서 12시간 동안 삼투시켰다. 원심분리 (300 x g, 10분) 후 세포를 1.5ml microcentrifuge tube로 옮기고 평형완충액으로 완충 후 Triton X-100으로 처리 후 RNase A를 포함하는 propidium iodide로 DNA를 염색하였다. FACScan 유세포분석기 (Becton Dickinson, USA)로 Lysis II program을 사용하여 DNA 용적히스토그램을 얻고 AUTOCAD13 program을 이용하여 DNA 용적의 백분율을 구하였다.

apoptosis 양성반응을 보고자 1μg/ml DNase I (Sigma, USA)를 10분간 고정된 세포에 처리하고 유세포분석을 시행하여 pre-G1 피크를 확인하였다.

4. 사멸한 세포의 LDH 분석

4 well dish에 5×10^4 개의 세포를 넣어 방사선조사 직전 배양액을 교환하고 방사선조사 1일 후에 과사된 세포의 양을 알기 위하여 상층액을 50 μ 씩 96 well assay plate로 옮겼다. 이 때 positive control을 위하여 20,000:1, 10,000:1, 5,000:1로 희석한 LDH control 용액도 같은 plate에 옮기고 배지도 옮겼다. LDH 분석시약을 각 well에 50 μ 씩 옮기고 실온상태의 암실에서 30분간 배양한 후 반응정지액을 넣고 ELISA reader로 490nm에서 측정하였다.

III. 연구성적

1. Apoptosis 분석

가) Apoptosis 관찰

KB, RPMI2650, HGF-1 세포 모두에서 정상적인 세포의 핵은 하나의 동그란 모양으로 관찰되었으나 apoptosis된 세포들은 핵이 분열되어 불규칙한 모양을 보이거나 여러 개의 작은 조각으로 관찰되었다. 분열된 핵을 가진 세포 중에는 세포가 부풀어서 커진 모양을 보이는 것이 있었고 세포의 경계가 다소 불분명하였다 (Figure 1a, b, c).

나) 유세포 분석

가로축은 DNA의 상대적 크기를 나타내고 세로축은 DNA의 수를 나타내는 DNA용적히스토그램에서 다음과 같은 실험성적을 얻었다.

방사선을 조사하지 않은 KB 세포의 G1기는 200 부위에서 피크를 보였으며 G2기는 400 부위에서 작은 피크를 보였다. pre-G1 피크는 4.5% 있었으며 G1기 세포는 전체의 64.0%, S+G2기 세포는 35.0%였다 (Figure 2, Table 1). KB세포에 2, 10, 20 Gy의 방사선을 조사하였을 때 pre-G1 피크는 각각 55.0%, 52.3%,

Cell Number

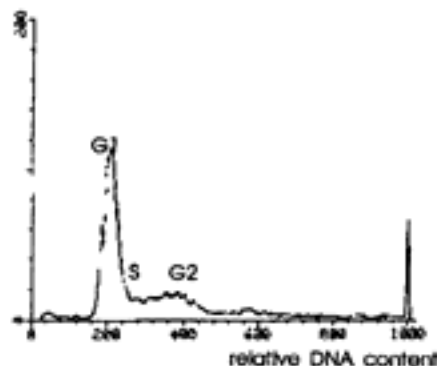


Figure 2. DNA content histogram of the control KB cells.
Pre-G1 peak:4.5%

Table 1. Relative Percentage of the DNA Stage on the DNA Content Histogram according to the Irradiation Dose.

Cells	pre-G1	G1	S+G2
KB control	4.5	64.0	35.0
KB 2Gy	55.0	34.8	9.3
KB 10Gy	52.3	31.7	14.5
KB 20Gy	66.6	31.1	14.6
RPMI 2650 control	2.7	67.8	35.5
RPMI 2650 2 Gy	3.3	52.0	47.9
RPMI 2650 10 Gy	31.6	33.2	34.0
RPMI 2650 20 Gy	32.6	33.3	35.2
HGF-1 control	2.6	65.9	31.9
HGF-1 2 Gy	21.8	53.2	17.7
HGF-1 10 Gy	30.4	60.0	14.0
HGF-1 20 Gy	40.2	52.6	14.4

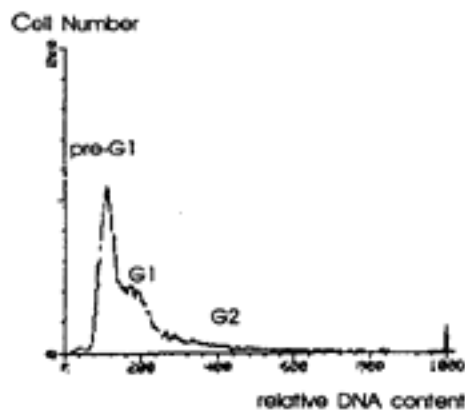


Figure 3. DNA content histogram of the KB cells irradiated with 2 Gy.
pre-G1 peak: 55.0%

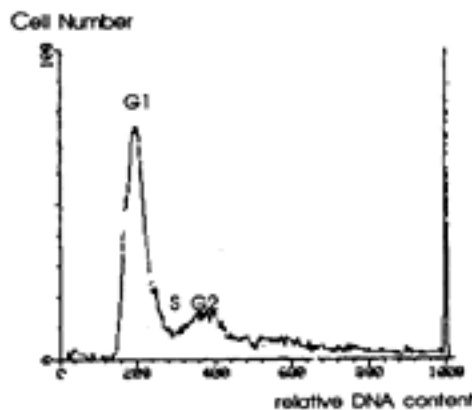


Figure 6. DNA content histogram of the control RPMI 2650 cells.
pre-G1 peak: 2.7%

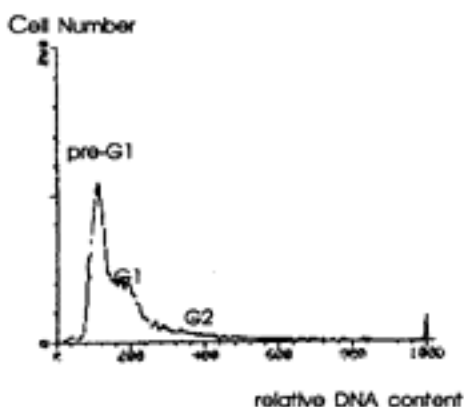


Figure 4. DNA content histogram of the KB cells irradiated with 10 Gy.
pre-G1 peak: 52.3%

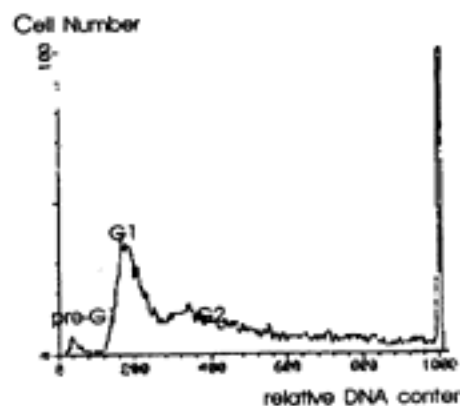


Figure 7. DNA content histogram of the RPMI 2650 cells irradiated with 2 Gy.
pre-G1 peak: 3.3%

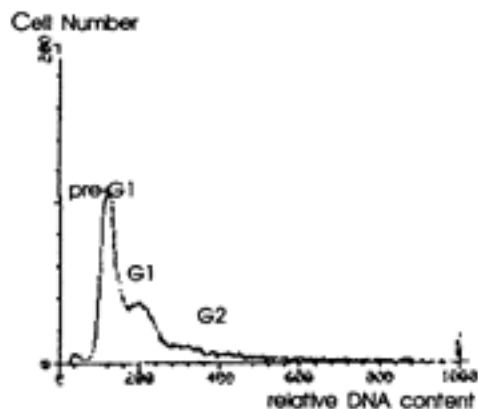


Figure 5. DNA content histogram of the KB cells irradiated with 20 Gy.
pre-G1 peak: 66.6%

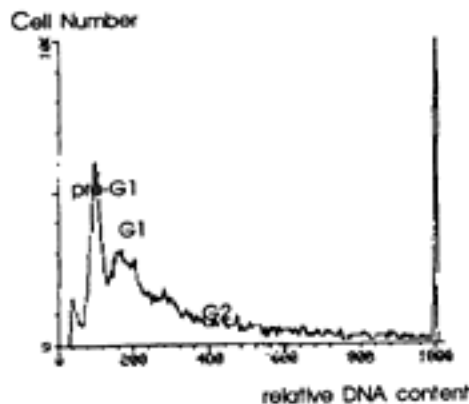


Figure 8. DNA content histogram of the RPMI 2650 cells irradiated with 10 Gy.
pre-1 peak: 31.6%

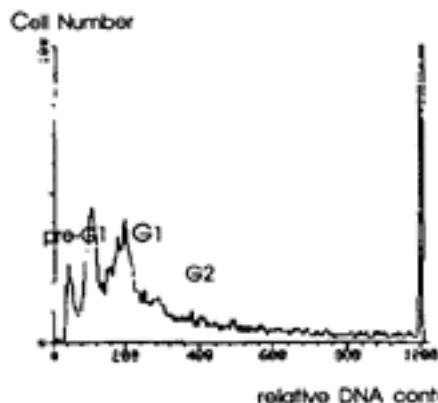


Figure 9. DNA content histogram of the RPMI 2650 cells irradiated with 20 Gy.
pre-G1 peak: 32.6%

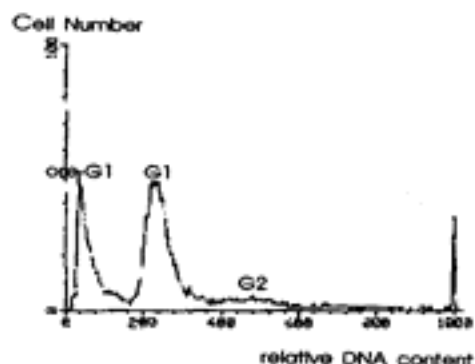


Figure 12. DNA content histogram of the HGF-1 cells irradiated with 10 Gy.
pre-G1 peak: 30.4%, 35.2%였다 (Figure 7-9, Table 1).

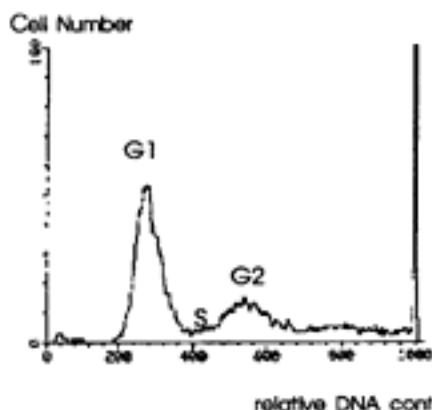


Figure 10. DNA content histogram of the control HGF-1 cells.
pre-G1 peak: 2.6%

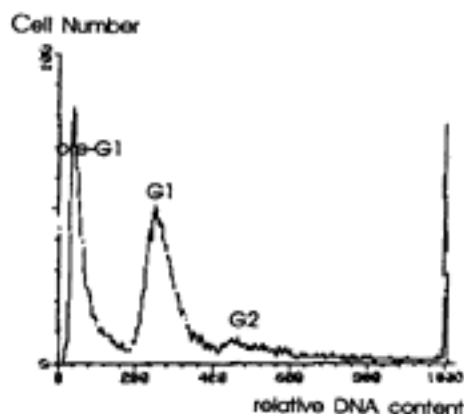


Figure 13. DNA content histogram of the HGF-1 cells irradiated with 20 Gy.
pre-G1 peak: 40.2%

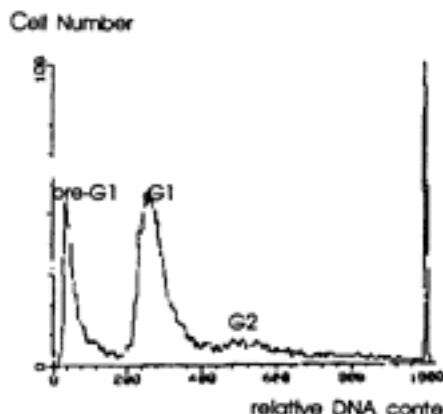


Figure 11. DNA content histogram of the HGF-1 cells irradiated with 2 Gy.
pre-G1 peak: 21.8%

66.6%였으며 G1기 세포는 각각 34.8%, 31.7%, 31.1%였고 S+G2기 세포는 각각 9.3%, 14.5%, 14.6%였다 (Figure 3-5, Table 1).

방사선을 조사하지 않은 RPMI 2650 세포의 G1기는 200 부위에서 피크를 보였으며 G2기는 400 부위에서 작은 피크를 보였다. pre-G1 피크는 2.7%였으며 G1기 세포는 전체의 67.8%, S+G2기세포는 35.5%였다 (Figure 6, Table 1). RPMI 2650 세포에 2, 10, 20 Gy의 방사선을 조사하였을 때 pre-G1피크는 각각 3.3%, 31.6%, 32.6%였으며 G1기 세포는 각각

Table 2. Optical Density of the LDH Concentration in Supernatant according to the Irradiation Dose (S.D.).

	0	2	10	20
KB	0.68(0.02)	0.67(0.03)	0.69(0.01)	0.60(0.01)
RPMI 2650	0.61(0.06)	0.62(0.07)	0.69(0.06)	0.66(0.09)
HGF-1	0.49(0.06)	0.47(0.01)	0.43(0.03)	0.47(0.06)

O. D. of the media:0.28

O. D. of the positive control:1.66

KB:CCL17, RPMI 2650:CCL30, HGF-1:CRL2014

52.0%, 33.2%, 33.3%였고 S+G2기 세포는 각각 47.9%, 34.0%, 35.2%였다. (Figure 7-9, Table 1.)

방사선을 조사하지 않은 HGF-1 세포의 G1기는 270 부위에서 피크를 보였으며 G2기는 540 부위에서 작은 피크를 보였고 pre-G1 피크는 2.6%였으며 G1기 세포는 전체의 66.0%, S+G2기 세포는 31.9%였다 (Figure 10, Table 1). HGF-1세포에 2, 10, 20 Gy 방사선을 조사하였을 때 pre-G1피크는 각각 21.8%, 30.4%, 40.2%였으며 G1기 세포는 각각 51.2%, 60.0%, 52.6%였고 S+G2기 세포는 각각 17.7%, 14.0%, 14.4%였다 (Figure 11-13, Table 1).

2. 사멸한 세포의 LDH 분석

사멸한 세포의 LDH 분석 결과 방사선조사량의 증가에 따라 LDH 양이 다소 증가되었으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다 (Table 2).

IV. 총괄 및 고안

apoptosis는 여러 세포에서 여러 가지 주변자극에 의하여 일어나는 세포사의 한 형태로서^{1, 2, 30} 초기에 apoptosis에 대한 연구와 발견은 주로 형태학적 분야에 관한 것이었다^{13-14, 30}. 왜냐하면 apoptosis 과정에서 internucleosomal (spacer) DNA 부위에 친화력이 있는 내인성의 엔도뉴클리아제 (endogenous endonuclease)의 활성화로 인하여 핵과 세포질에 특이한 형태학적 이

상이 일어나기 때문이다^{3, 30}. apoptosis를 일으키는 엔도뉴클리아제로는 NUC-18³⁰, DNase I³⁰, DNase II³⁰ 등이 알려져 있으나 엔도뉴클리아제로 인한 DNA의 분열 여부는 아직도 불명확하다. Barres 등³⁰은 회소돌기아교세포 (oligodendrocyte)가 죽을 경우 염색질(chromatin)의 농축이 관찰됨을 보고하였고 Oberhammer 등³¹은 간세포의 apoptosis에서 엔도뉴클리아제로 인한 DNA 분열의 증거는 없었다고 보고하였다. 또한 Cohen 등³²은 apoptotic 흉선세포(thymocyte)의 유세포분석에서 internucleosomal DNA 분열 없이 염색질 구조의 변화가 있었음을 보고하였으며 Arends 등³⁰은 apoptotic 세포의 30% 정도는 핵의 분열을 동반하지 않으며 DNA의 용적이나 염색성의 변화가 세포의 분열된 핵의 형태변화보다 apoptosis의 발생을 관찰하는데 더욱 유용하다고 하였다. DNA의 염색성에 변화가 생기는 이유는 apoptotic 세포의 염색질의 구조가 변화하기 때문인데^{3, 30} 이로 인한 apoptotic 세포의 용적이나 염색성의 감소 정도는 apoptosis의 발생 정도와 매우 일치한다고 보고되었다.³⁰ apoptosis의 후반기에는 원형질막에 둘러싸여 있고 DNA와 세포내용물을 포함하는 apoptotic body가 생긴다^{2, 30}. apoptotic 세포에서와는 달리 괴사세포(necrotic cell)에서는 DNA 염색성의 즉각적인 감소는 관찰되지 않아 괴사세포와 정상세포를 DNA 용적으로 구별할 수는 없다. apoptotic 세포는 원형질막의 형태가 유지되고 막의 기능도 대부분 유지되므로^{2, 30} trypan blue염색으로 생활성분석시에는 생활세포로 취급된다³⁰. 그러나 괴사에서는 처음 변화중의 하나가 막의

기능의 상실이므로 trypan blue염색으로 판별할 수 있으며¹³⁾ LDH 분석도 가능하다.

세포 내용물 중의 하나인 LDH는 중요한 효소로서 상당히 안정적이며¹⁴⁾ 세포가 파괴되면 세포밖으로 나오게 되는데¹⁵⁾ 이것의 양을 발색반응으로 측정하여 정량적으로 분석할 수 있다¹⁶⁻²⁰⁾.

본 실험에서는 방사선조사 후의 발생된 apoptosis를 유세포분석을 통하여 조기에 관찰하였는 바 KB 세포에서는 2Gy 조사시 pre-G1 피크가 50% 이상으로 나타났고 그 이상의 조사량 증가에 따른 차이는 적었다. RPMI 2650 세포에서는 2Gy 조사시 대조군에 비하여 큰 차이가 없었으나 10Gy 조사시 큰 증가가 있었고 10Gy와 20Gy 조사시에는 큰 차이가 없었다. HGF-1 세포에서는 2Gy 조사시 pre-G1 피크가 크게 증가하였으며 조사량의 증가에 따라 21.8, 30.4, 40.2%로 점진적인 증가 양상을 보였다. 이와 같이 방사선조사 후 종양세포의 종류에 따라 apoptosis의 발현 정도가 달랐는데 정상 섬유모세포에 비하여 KB세포에서는 더 많이 발생하였으나 RPMI 2650세포에서는 오히려 작게 발생하였다. 본 실험에서는 방사선 이외의 자극에 의한 apoptosis의 발생을 배제하기 위하여 apoptosis 분석을 시행하는 시간까지 세포들이 플라스크 바닥에서 90% 이하의 세포밀도를 보이도록 하여 저산소로 인한 세포의 변형을 방지하였다.

유세포분석으로는 정상세포와 괴사세포의 감별이 불가능하므로 LDH 분석을 실행하였다. 방사선조사 1 일 후 배지내에 방출된 LDH는 대조군과 실험군에서 유의한 차이가 없었다. 즉 선량을 241.5 cGy/min로 2에서 20Gy의 방사선을 조사하였을 때는 세포괴사보다는 apoptosis에 의한 세포사가 방사선감수성에 더 큰 의미를 가진다고 생각된다. 방사선조사 1 일 후의 LDH분석의 결과는 방사선 조사 4 일후 LDH분석을 시행한 이와 유²¹⁾의 연구결과와 차이가 있었는데 이들은 방사선조사량과 세포의 종류에 따라 사멸세포의 LDH양은 차이가 있었다고 보고하였다. 이 같은 연구결과와 차이는 방사선조사 후의 경과 시간이 1 일과 4 일로 서로 다르기 때문으로 생각되며 이것은 방사선조사 후 발생된

apoptotic 세포가 생체내에서는 포식되는 데 반하여 배양 환경에서는 시간이 경과하면서 괴사되어 세포질이 방출되는 것으로 생각된다.

방사선이 apoptosis를 유발한다는 것이 알려지고 종양의 치료에 이를 이용하고자 하는 연구가 이루어지고 있다²²⁾. Delic 등²³⁾은 백혈병환자에서 2Gy의 저선량의 방사선치료 후 백혈구에서 apoptosis가 발생된 것을 보고하였으며 Kubota 등²⁴⁾은 흉선세포에서는 5Gy의 방사선조사시 apoptosis가 일어났음에 비하여 폐포대식세포에서는 50Gy 조사시 apoptosis가 일어났음을 보고하였고 Gorczyca 등²⁵⁾은 HL-60 (leukemic cell)에 20Gy의 방사선을 조사시 apoptosis가 일어남을 보고하였다. 이와 같이 세포의 종류와 상태에 따라 apoptosis를 일으키는 방사선조사량은 다양함을 알 수 있다. p53은 종양억제유전자로서 종양의 발육을 정지시키고 조절하는 것으로 알려져있으며 이것이 apoptosis를 일으킨다는 보고가 있으며²⁶⁾ Clarke 등²⁷⁾과 Lowe 등²⁸⁾은 화학요법과 방사선은 p53-dependent pathway를 통하여 세포사를 일으킨다고 하였다. 따라서 p53의 변형은 종양을 발생시킬 뿐만 아니라 화학요법과 방사선에 대한 저항성도 증가시키게 된다. 그러나 Oltvai와 Korsmeyer²⁹⁾는 천천히 자라는 종양의 p53^{-/-} lymphocyte는 방사선에 저항적이었으나 빠르게 분열하는 종양에서는 p53^{-/-}인 경우에도 apoptosis가 발생하는 것을 보고하였다. 결과적으로 빠르게 분열하는 종양에서는 p53에 독립적인 경로가 존재한다고 사료되나 아직 밝혀지지 않는 것이다. 이와 같이 각각의 세포들에서 특성과 상황에 따라 방사선에 의한 apoptosis의 발생이 다양하다. 따라서 본 연구는 악구강영역의 세포들에서 방사선조사에 의하여 apoptosis의 발생 여부에 관한 자료를 더해 줄 것이며 apoptosis를 방사선조사량에 따라 정량적으로 분석한 초기 연구가 되어 종양세포의 경우에는 각각의 세포에서 방사선조사시 apoptosis를 일으킬 수 있는 가장 효율적인 조사량을 알아내고 정상 세포에서는 apoptosis를 줄일 수 있는 조사량을 얻어 보다 효과적인 방사선치료에 필요한 기초 자료를 더해 줄 수 있을 것으로 기대된다.

한국세포주은행에서 분양받은 ATCC No. CCL17(KB)인 인체의 구강내 유포피암종세포주, ATCC No. CCL30(RPMI 2650)인 인체의 비종격에서 발생한 분화도가 낮은 편평상피암종세포주, ATCC No. CRL 2014(HGF-1)인 치은섬유모세포주에 Cs-137 동물실험용 방사선 조사기를 사용하여 선량을 241.5 cGy/min로 2, 10, 20Gy를 단일조사하였다. 방사선조사 1일 후에 DNA에 선택적으로 염색되는 색소인 propidium iodide로 염색 후 형광현미경으로 핵의 형태를 관찰하고 유세포분석기를 이용하여 세포 분열 및 성장주기에 따른 DNA용적히스토그램을 얻고 사멸한 세포의 LDH분석을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 방사선조사 후에 KB, RPMI 2650, HGF-1세포에서 형광현미경으로 분열된 핵을 관찰할 수 있었다.
2. 유세포 분석으로 얻어진 DNA용적히스토그램에서 pre-G1 피크는 대조군, 2, 10, 20Gy 조사군에서 KB세포에서는 4.5, 55.0, 52.3, 66.6%였고 RPMI 2650세포에서는 2.7, 3.3, 31.6, 32.6% 였으며 HGF-1세포에서는 2.6, 21.8, 30.4, 40.2%로 나타났다.
3. G1기 세포수는 KB세포에서는 2Gy 조사후부터, RPMI 2650세포에서는 10Gy 조사후부터 급격히 감소하였으나 HGF-1세포에서는 조사량에 관계없이 다소의 감소만을 보였다.
4. 괴사된 KB, RPMI 2650, HGF-1세포의 LDH분석시 유의성 있는 차이는 없었다.

참고문헌

1. Arends MJ, Wyllie AH: Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223-254, 1991.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging

- implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972.
3. Marts E, Howell DM: CTR, virus control cells first and cytolytic cells second? *Immunol Today* 10:79-86, 1989.
4. Willians GT: Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65:1097-1098, 1991.
5. Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, Leblanc J, Chaly N: The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in stimulated mature murine lymphocytes. *Exp Cell Res* 200:416-424, 1992.
6. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501, 1992.
7. Steiler H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449, 1995.
8. Raff MC: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356(6368):397-400, 1992.
9. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC: Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 13:1899-1910, 1994.
10. Vaux DL, Haeccker G, Strasser A: An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76(5):777-779, 1994.
11. Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R: Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 13:245-251, 1992.
12. Kerr JFR, Harmon BV: Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: *Apoptoses: The Molecular Basis of Cell Death*, *Curr, Commun. Cell & Mol. Biol.*, Vol. 3, Tomei LD, Cope FO (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 5-29, 1991.
13. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG: Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24:203-214, 1991.
14. Schrek R, Chandra S, Molnar Z, Stefani S: Two types of interphase death of lymphocytes exposed to temperatures of 37-45°C. *Radiat Res* 82:62-170, 1981.
15. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462, 1995.
16. Sachs L, Lotem J: Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 82:15-21, 1993.
17. Buttke TM, Sandstrom PA: Oxidative stress as

- a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15:7-10, 1994.
18. Reed JC: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124:1-6, 1994.
 19. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK: Prevention of programmed cell death on *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258:1955-1957, 1992.
 20. Bertrand R, Kerrigan D, Sarang M, Pommier Y: Cell death induced by topoisomerase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 42:77-85, 1991.
 21. Dive C, Hickman JA: Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer* 64:192-196, 1991.
 22. Kaufmann SH: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs. A cautionary note. *Cancer Res* 49:5870-5878, 1989.
 23. Krishan A, Frei E: Morphological basis for the cytolytic effect of Vinblastine and Vincristine on cultured human leukemic lymphocytes. *Cancer Res* 35:497-501, 1975.
 24. Szende B, Zalstnai A, Schally AV: Programmed cell death (apoptosis) in pancreatic cancers of hamsters after treatment with analogs of both luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin. *Proc Natl Acad Sci* 86:1643-1647, 1989.
 25. Afanas'ev VN, Korol' BA, Mantsygin YA, Nelipovich PA, Pechtnikov VA, Umansky SR: Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS* 194:347-350, 1986.
 26. Compton MM, Haskill JS, Cidlowski JA: Analysis of glucocorticoid actions on rat thymocyte deoxyribonucleic acid by fluorescence-activated flow cytometry. *Endocrin* 122:2158-2164, 1988.
 27. Cowden RR, Curtis SK: Microfluorometric investigations of chromatin structure. *Histochem* 72:11-23, 1981.
 28. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH: Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1133:275-285, 1992.
 29. Ojeda F, Guarda MI, Maldonado C, Folch H: Protein kinase-C involvement in thymocyte apoptosis induced by hydrocortisone. *Cell Immunol* 125:535-539, 1990.
 30. Swat W, Ignatowicz L, Kisielow P: Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Meth* 137:79-87, 1991.
 31. Telford WG, King LE, Fraker PJ: Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* 13:137-143, 1992.
 32. Telford WG, King LE, Fraker PJ: Evaluation of glucocorticoid induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif* 24:447-459, 1991.
 33. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Bino GD, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13:795-808, 1992.
 34. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH: Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136:593-608, 1990.
 35. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell Death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306, 1980.
 36. Compton MM: A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11:105-119, 1992.
 37. Caron-Leslie LM, Schwartzman RA, Gaido ML, Compton MM, Cidlowski JA: Identification and characterization of glucocorticoid-regulated nuclease(s) in lymphoid cells undergoing apoptosis. *J Steroid Biochem* 40:661-671, 1991.
 38. Ucker DS, Obermiller PS, Eckhart W, Apgar JR, Berger NA, Meyers J: Genome digestion of a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 12:3060-3069, 1992.
 39. Barry MA, Eastman A: Identification of deoxyribonuclease II as involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 300:440-450, 1993.
 40. Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC: Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46, 1992.
 41. Oberhammer F, Fritsch G, Schmieid M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Laszmann H, Schulte-Hermann R: Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J Cell Sci* 104:317-326, 1993.
 42. Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN: Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of

- internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286:331-334, 1992.
43. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Kapuscinski J, Staiano-Coico L, Melamed MR: Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry* 5:355-363, 1984.
 44. Evenson D, Darzynkiewicz Z, Jost L, Janca F, Ballachey B: Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry* 7:45-53, 1986.
 45. Del Bino G, Lassota P, Darzynkiewicz Z: The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Exp Cell Res* 193:27-35, 1991.
 46. Arlett CF, Harcourt SA: Survey of radio sensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res* 40:926-932, 1980.
 47. Wroblewski F, LaDue JS: Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 90:2100-213, 1955.
 48. Gulliksson H: Adenylate kinase as a marker for platelet lysis. *Transfusion* 30:536-540, 1990.
 49. Kitamura C, Terashita M, Toyoshima K, Noguchi T: The presence of vesicles containing lactate dehydrogenase on the ameloblast layer of bovine enamel organ. *Jap Oral Biol* 38:37-41, 1993.
 50. Jover R, Ponsoda X, Castell V, Gomez-Lechon MJ: Acute cytotoxicity of ten chemicals in human and rat cultured hepatocytes and in cell lines: correlation between in vitro data and human lethal concentrations. *Toxic. in Vitro* 8:47-54, 1994.
 51. Yu DS, Chang SY, Chen A, Ma CP, Su CJ, Chu TM: Effects of high-energy shock waves on murine renal cell carcinoma. *Urology* 34:571-576, 1991.
 52. Niks M, Otto M, Busova B, Stefanovic J: Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *J Immunol Meth* 126:263-271, 1990.
 53. Jayne AB, Steven NE: Rat mesangial cell lysis in vitro is induced by cationic polypeptides. *Am J Pathol* 142:529-539, 1993.
 54. Tinton SA, Lefebvre VH, Cousin OC, Buc-Calderon PM: Cytolytic effects and biochemical changes induced by extracellular ATP to isolated hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1176:1-6, 1993.
 55. Mbugua PM, Welder AA, Acosta D: Cardio toxicity of kenyan green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) venom and its fractionated components in primary cultures of rat myocardial cells. *Toxicology* 52:187-207, 1988.
 56. 이삼선, 유동수: 수종의 암세포주와 치은섬유아세포에서 방사선의 양과 분할조사에 따른 세포활성도와 독성의 변화에 관한 연구. *치과방사선* 27(1):107-122, 1997.
 57. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026, 1994.
 58. Delic J, Magdelenat H, Barbaroux C, Chaillet MP, Dubray B, Gluckman E, Fourquet A, Girinsky T, Cosset JM: In vivo induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *Br J Rad* 68:997-1003, 1995.
 59. Kubota Y, Takahashi S, Sato H: Effect of γ -irradiation on function and viability of alveolar macrophages in mouse and rat. *Int J Radiat Biol* 65:335-344, 1994.
 60. Gorczyca W, Gong J, Ardelt B, Traganos F, Darzynkiewicz Z: The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res* 53:3186-3192, 1993.
 61. Yonish-Rouach E, Resnitsky D, Lohem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wild-type p53 induced apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352:345-347, 1991.
 62. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362:849-852, 1993.
 63. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74:957-967, 1993.
 64. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ: Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79:189-192, 1994.

IRRADIATION EFFECT ON THE APOPTOSIS INDUCTION IN THE HUMAN CANCER CELL LINES AND THE GINGIVAL FIBROBLAST

Moo-Soon Park, Sam-Sun Lee, Soon-Chul Choi, Tae-Won Park, Dong-Soo You

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute,
College of Dentistry, Seoul National University*

The radiation-induced apoptosis was studied for two human cancer cell lines (KB cells, RPMI 2650 cells) and the human gingival fibroblast cell line (HGF-1 cells). The single irradiation of 2, 10, 20Gy was done with 241.5 cGy/min dose rate using the ¹³⁷Cs MK cell irradiator. The cells were stained with propidium iodide and examined under the fluoro-microscope and assayed with the flow cytometry a day after irradiation. Also, the LDH assay was done to determine the amount of necrotic cells.

The obtained results were as follows:

1. On the fluoro-microscope, many fragmented nuclei were detected in the KB, RPMI 2650, and HGF-1 cells after irradiation.
2. On the DNA content histogram obtained from the flow cytometry, the percentages of the pre-G1 peak of the control and 2, 10 and 20Gy irradiation group were 4.5, 55.0, 52.3, and 66.6% on KB cells, 2.7, 3.3, 31.8, and 32.6% on RPMI 2650 cells and 2.8, 21.8, 30.4, and 40.2% on HGF-1 cells respectively.
3. The number of G1-stage cells was abruptly decreased after 2Gy irradiation on KB cells and 10Gy irradiation on RPMI 2650 cells, But there was a slight decrease without regard to irradiation dose on HGF-1 cells.
4. There was no significantly different absorbance in extracellular LDH assay along the experimental cell lines.

논문사진부도설명

- Figure 1-a. Fluoro-microscope of KB cells (20 Gy irradiation, X200).
Apoptotic cells with fragmented nuclei and pedunculated protuberances the cell surface.
- Figure 1-b. Fluoro-microscope of RPMi 2650 cells (20 Gy irradiation, X200).
Apoptotic cells with fragmented nuclei.
- Figure 1-c. Fluoro-microscope of HGF-1 cells (20 Gy irradiation, X400).
Apoptotic cells with fragmented nuclei.

사진부도

