

# HeLa 세포에서 Adriamycin에 의해 유도된 Apoptosis

경상대학교 의과대학 병리학교실 및 계명대학교 의과대학 병리학교실\*

김 선 영 · 이 상 숙\*

## Apoptosis Induced by Adriamycin in HeLa Cells

Sun Young Kim, M.D. and Sang Sook Lee, M.D.\*

Department of Pathology, Gyeongsang National University College of Medicine and  
Keimyung University School of Medicine\*

This study was carried out to demonstrate the mode of ADR-induced cell death(apoptosis) on the light and electron microscopic features, to measure the apoptotic index dependent on various doses of ADR, to investigate the possible mechanism of apoptosis induced by ADR, and to evaluate ISNT method for the detection of DNA strand break.

HeLa cells were treated with various doses of ADR, 0.1~100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and observed under the light and transmission electron microscopes at 6 hours, 1 day and 3 days after ADR treatment. In addition, DNA strand breaks induced by ADR were detected in HeLa cells using the in situ nick translation(ISNT) method.

The results were as follows:

1) The cell viability of HeLa cells decreased and the apoptotic index increased following exposure to ADR in a dose-dependent manner, resulting in about 44% of apoptotic index at 100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ADR treatment.

2) Light microscopically, HeLa cells treated with ADR showed shrinkage or condensation of nucleus and cytoplasm. There were various nuclear changes showing irregular, large, delineated masses of condensed chromatin abutting on the nuclear envelopes. Later stage of apoptosis revealed contracted and condensed cytoplasm with irregular cell membrane.

Electron microscopically, margination of condensed chromatin, dilatation of endoplasmic reticulum under the plasma membrane, aggregation of cytoplasmic organelles with morphologically intact mitochondria, and irregular cell surface with blebbing were observed.

3) ISNT using biotinylated dUTP exhibited strong positive nuclear staining in HeLa cells treated with ADR. There was a marked response at 10.0~20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ADR treatment.

It is concluded from the above results that the death of HeLa cells induced by ADR was apoptotic in type based on light and electron microscopic appearances. The apoptotic index correlated with the increasing dose of ADR. ISNT with biotinylated dUTP led to visible evidence of DNA strand breaks following ADR treatment of HeLa cells. ISNT can be used for detection of DNA degradation, caused by activation of endogenous endonuclease, which is an early and specific characteristic of apoptosis. (**Korean J Pathol 1993; 27: 433~442**)

**Key Words:** Adriamycin, Apoptosis, HeLa cell, In situ nick translation

접 수: 1993년 1월 16일, 게재승인: 1993년 5월 25일  
주 소: 경남 울산시 대화동 123-3번지, 우편번호 681-320  
동강병원 해부병리과, 김선영

\*이 논문은 1992년도 경상대학병원 임상연구비의 일부 보조로 이루어졌음.

서 론

Adriamycin(ADR)은 세포 독성을 나타내는 anth-

racycline항생제로 streptomyces peucetius var. caesius에 의해 만들어지며 고형 및 혈관계 악성종양을 포함한 광범위한 악성종양의 치료를 위해 사용되는 가장 중요한 항암제 중의 하나이다<sup>1-3</sup>). ADR의 세포독성의 기전에 대해 많은 연구가 되어 왔으나 아직 불확실하다<sup>1-7</sup>). ADR의 주요 작용 기전으로 ADR이 DNA에 침투하여 DNA 복제 및 RNA와 단백질 합성을 막고, 약제가 없는(drug-free) 기근(radical)의 형성과 철 또는 구리 같은 전이 금속(transition metal)이온의 킬레이트화(chelation)를 일으키며, 그 밖에 저농도에서 ADR이 세포막과 직접 작용하여 세포막의 기능 이상을 초래한다고 알려져 있다<sup>1-5</sup>). 특히 약제가 없는 기근의 형성으로 말미암아 ADR의 가장 중요한 부작용인 심근증(cardiomyopathy)이 생긴다고 생각하고 있다<sup>1,3</sup>). 최근에는 ADR이 topoisomerase II에 작용하여 DNA를 파괴하여 세포의 죽음을 일으킨다는 보고가 있다<sup>4,6,7</sup>). Tritton<sup>4</sup>에 의하면 ADR이 세포막에 작용하여 인지질의 교체와 세포에 diacylglycerol을 증가시켜 PKC(protein kinase C)를 활성화시키고 topoisomerase II를 포함한 많은 기질의 인산화를 증가시킴으로서 DNA파괴를 일으킨다고 주장하였다.

ADR의 세포 독성으로 인해 생긴 세포의 병변을 형태학적으로 자세히 연구한 논문은 적지만 고사(apoptosis)와 유사한 변화를 일으킨다는 보고가 있다<sup>8</sup>). 고사는 계획되어진 세포의 죽음(programmed cell death)으로 괴사와는 달리 단일 세포의 소실을 일으키고 주변에 염증 반응을 동반하지 않으며, 또한 형태학적 및 생화학적으로 다음과 같은 특징을 갖는다<sup>9-12</sup>). 고사는 형태학적으로 초기의 변화로서 핵염색질의 농축과 함께 세포질내 소기관의 밀도가 높아지고 세포질막에 소포들이 생긴다. 핵은 농축된 핵염색질이 핵막으로 편재된 뒤 분해(fragmentation)되어 세포 표면으로 돌출되어 떨어져 나가게 되는데 이때 독립된 막성구조물인 고사체(apoptotic body)를 형성한다. 그 후 고사체는 주위 세포 혹은 탐식 세포에 의해 탐식되어 소멸되는 과정을 밟는다<sup>13,14</sup>). 이 고사는 괴사와 달리 에너지와 단백질의 합성을 필요로 한다<sup>9</sup>). 생화학적으로 고사는 겔(gel) 전기 영동에서 180~200 base pairs의 특징적인 DNA분절상을 나타내는데 이는 핵에 위치하는 Ca<sup>++</sup>와 Mg<sup>++</sup> 이온에 의존하는 endonuclease의 활성화로 인해 핵체 사이에 위치한 연결(linker) DNA를 파괴시켜 생기는 것으로 추측된다<sup>9-12,15-17</sup>). 그밖에 고사의 특징적인 DNA손상을 탐지하는 한 방법으로 조직 혹은 배양된 세포 자체의 DNA손상을 탐지하는데 분자생물학 기법에서 흔히 사용되는 nick translation(NT)<sup>18</sup>)를 응용한 in situ nick translation(ISNT)의 적용 가능성이 제시되었다<sup>8,19,20</sup>). 고사는 정상적 조직 크기의 보존, 배아 형성의 과정, 내분비 홀몬등에 의존 하는 조직의 위축과

같은 생체항상성의 조절과 관계있으며 퇴행하는 종양에서도 생긴다. 고사는 전리 방사선(ionizing radiation)이나 자극된 T 임파구로부터 interleukin-2의 제거에 의해서도 발생하며 여러 화학요법제의 사용에 의해서도 생긴다<sup>9-12,15-17</sup>). 최근에 ADR에 저항하는 종양 세포가 빈번히 생김에 따라 ADR의 세포 독성에 저항하는 기전에 대한 연구가 활발하다<sup>8,21-24</sup>). 그러나 ADR의 세포 독성으로 인한 종양 세포의 형태학적 변화에 관해 연구된 논문은 거의 없는 실정이다.

그래서 본 실험에서는 HeLa 세포주를 ADR로 처리한 후 유도되는 세포의 죽음을 형태학적으로 고사임을 밝히고 또한 ADR의 농도에 따른 세포생존을 및 고사 지수(apoptotic index)를 측정하여 ADR의 농도와 세포 독성간의 관계를 파악하고자 하였다. 그리고 ADR로 유도된 HeLa 세포의 DNA 가닥의 파괴로 인한 핵의 변화를 ISNT방법으로 관찰하여 고사의 조기 추적 가능성 및 ADR의 농도에 따른 DNA 가닥의 파괴 정도와의 관계를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

HeLa 세포주(ATCC CCL-2)를 10 cm 직경의 배양 접시(petri dish)에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco, USA)과 항생제(100 units penicillin and 100 µg streptomycin/ml, Gibco, USA)가 포함된 Minimal Essential Media(MEM, Gibco, USA)로 단층으로 배양하였다. 배지는 3~4일마다 교환해 주었다.

### 2. 약물 및 약물 처리

1) **약물:** Adriamycin(염산독소루비신, 에이디엠 5 mg/ml, 동아제약)을 증류수로 희석하여 1 mg/ml의 농도를 만든 후 적당량의 MEM을 사용하여 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0 µg/ml의 농도를 만들어 사용하였다.

2) **약물 처리:** 배양 접시에 자란 HeLa 세포를 0.25% trypsin(Sigma, USA)으로 37°C에서 5~10분간 처리하여 단일 세포 부유물을 만들었다. 그 후 HeLa 세포의 농도를 1×10<sup>5</sup>개/ml로 조정하여 6 cm 직경의 배양 접시에 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 48시간동안 배양하였다. 일부는 미리 염산으로 처리하여 고온에서 멸균한 22×22 mm의 덜게유리판을 넣은 배양 접시를 사용하였다. 그 후 각 배양 접시에 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0 µg/ml 농도의 ADR이 섞인 배지를 투여하여 37°C에서 1시간 처리하였다. 그 후 ADR이 섞인 배지를 없애고 phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4로

2분간 세척하여 세포에 남아 있는 ADR를 제거하였다. 그 다음 10% 우태아혈청과 항생제가 포함된 새 MEM 배지로 교환하여 72시간 동안 더 배양하였다.

### 3. 세포 생존율 및 고사 지수(apoptotic index) 판정

각기 다른 농도의 ADR에 의해 초래된 HeLa 세포들의 손상을 보고자 6 cm 배양 접시에 in situ trypan blue염색을 하여 100개 이상의 핵을 세어 푸르게 염색된(죽은) 세포와 염색되지 않은(산) 세포를 구분하였다. 실험은 3조로 나누어 실시하여 염색되지 않은 세포를 전체 세포로 나눈 백분율, 즉 세포생존율(cell viability, %)의 평균을 내었다. 고사 지수는 전체에서 세포생존율을 뺀 백분율로 산출하였다. ADR의 농도에 따른 HeLa 세포의 생존율 및 고사 지수를 검색, 비교하였다.

### 4. 형태학적 관찰

1) 광학현미경적 관찰: 세포 배양시 배양 접시에 미리 넣어 둔 덮개유리 혹은 배양 접시 자체와 단일 세포 부유물을 cytopsin하여 만든 슬라이드를 Giemsa 염색하여 ADR처리 후 6시간, 1일 및 3일째로 광학현미경으로 관찰하였다. Giemsa염색은 배양 접시의 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척한 후 PBS와 동일한 양의 메탄올을 부어 50% 농도의 메탄올로 만들었다. 그 후 100% 메탄올을 부어 10분동안 처리하였다. 신선한 Giemsa 염색액 2 ml를 부어 2분동안 두고 그뒤 8 ml의 물을 부어 혼합한 후 다시 2분 두어 염색하였다. 흐르는 물과 증류수에 씻은 후 물기가 있을 때 광학현미경으로 검경하였다. HeLa 세포가 자라 부착된 덮개유리와 cytopsin한 경우도 동일한 방법으로 Giemsa염색을 실시하였다.

2) 전자현미경적 관찰: 배양한 HeLa 세포의 단층 세포가 담긴 배양 접시에서 배양액을 제거한 뒤 trypsin으로 5~10분동안 처리하고 피펫으로 흡인분사를 반복 조작하여 기계적으로 세포를 분리하여 단일 세포 부유물을 만들었다. 1000 RPM으로 6분동안 원심 분리하여 상층액은 버리고 남은 세포 침전물을 전자현미경 관찰용으로 사용하였다.

세포 침전물을 2.5% glutaraldehyde 용액으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1M PBS로 세척한 후 1% OsO<sub>4</sub> 용액에서 2시간 후고정을 실시하고 같은 PBS로 세척하여 계열 에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법<sup>26)</sup>에 의한 epon 혼합물을 포매하여 37°C에서 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하여 toluidine blue염색을 하여 관찰 부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont diamond칼을 부착

하여 회백색(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박 절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson<sup>26)</sup> 및 Reynolds방법<sup>27)</sup>에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

### 5. In situ nick translation(ISNT)과 염색

Nick translation assay를 위해 HeLa 세포를 Lab-Tek tissue culture chamber/slides(Miles Scientific, USA)에 키워 다양한 농도의 ADR으로 처리 하였다. Lab-Tek 슬라이드로부터 배양 용기를 제거하고 PBS로 세척한 후 70% 에탄올에 실온에서 10분동안 고정하였다. 50 mM tris-buffered saline (TBS), pH 7.5에 3회, 각 5분동안 세척하고 그 다음 5 mM MgCl<sub>2</sub>에 3회, 각 5분간 세척하였다. 70%, 90%, 100% 에탄올에 순서대로 각각 2분씩 담구어 탈수하였다. NT용액을 Ueda<sup>28)</sup>에 의해 제시한 방법대로 만들어 슬라이드 위에 적당량 놓은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

NT 혼합물의 최종 농도는 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mg/ml bovine serum albumin (Sigma, USA), 각각 50 μM의 dATP, dCTP, dGTP(Sigma, USA), biotinylated 16-dUTP (Boehringer Mannheim, Germany), 0.01 M 2-mercaptoethanol(Sigma, USA)와 100 units/ml Escherichia coli DNA polymerase I(endonuclease-free, Boehringer Mannheim, Germany)로 이루어 졌다.

NT 반응 후 TBS에 담겨 반응을 종료하였다. DNA가 nick된 부위에 결합된 biotinylated dUTP를 streptavidin-biotin alkaline phosphatase방법에 의해 조직화학적으로 발색하였다. HeLa 세포에 있는 결합하지 않은 NT 혼합물을 TBS로 세척하여 제거한 후 조직 절편 위에 적당량의 streptavidin-alkaline phosphatase, 1:200(Vector, USA)을 놓은 후 37°C에서 30분동안 반응시켰다. TBS로 세척한 후 new fuchsin을 사용하여 발색하였으며 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. 양성반응의 HeLa세포들의 핵은 붉은색으로 염색되었다.

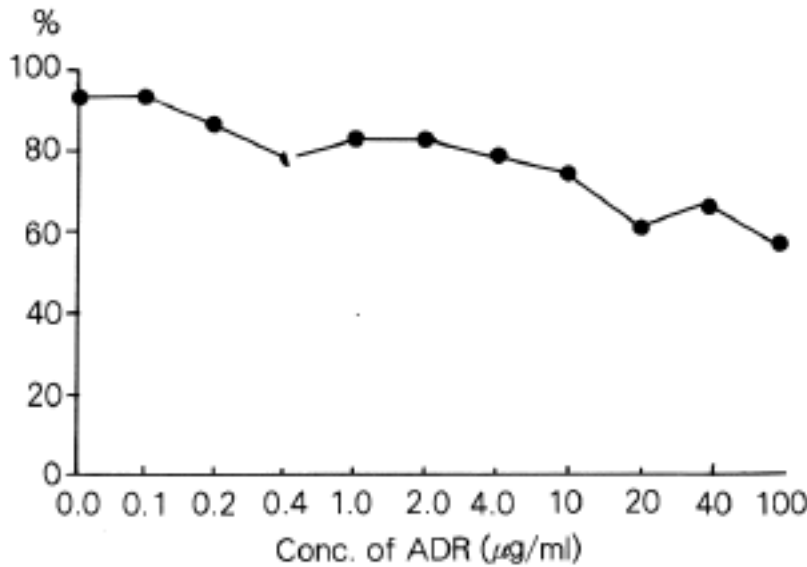
## 결 과

### 1. HeLa 세포의 생존율 및 고사 지수

HeLa 세포의 생존율은 대조군에서 평균 95%였으나 ADR의 농도가 증가함에 따라 점차 감소되어 100.0 μg/ml 농도의 ADR을 투여한 세포에서는 약 56%의 생존율을 나타내었다. 반면 고사 지수는 ADR의 농도에 비례하여 점차 증가되어 100.0 μg/ml의 ADR농도에서 약 44%였다(Fig. 1).

2. 형태학적 관찰

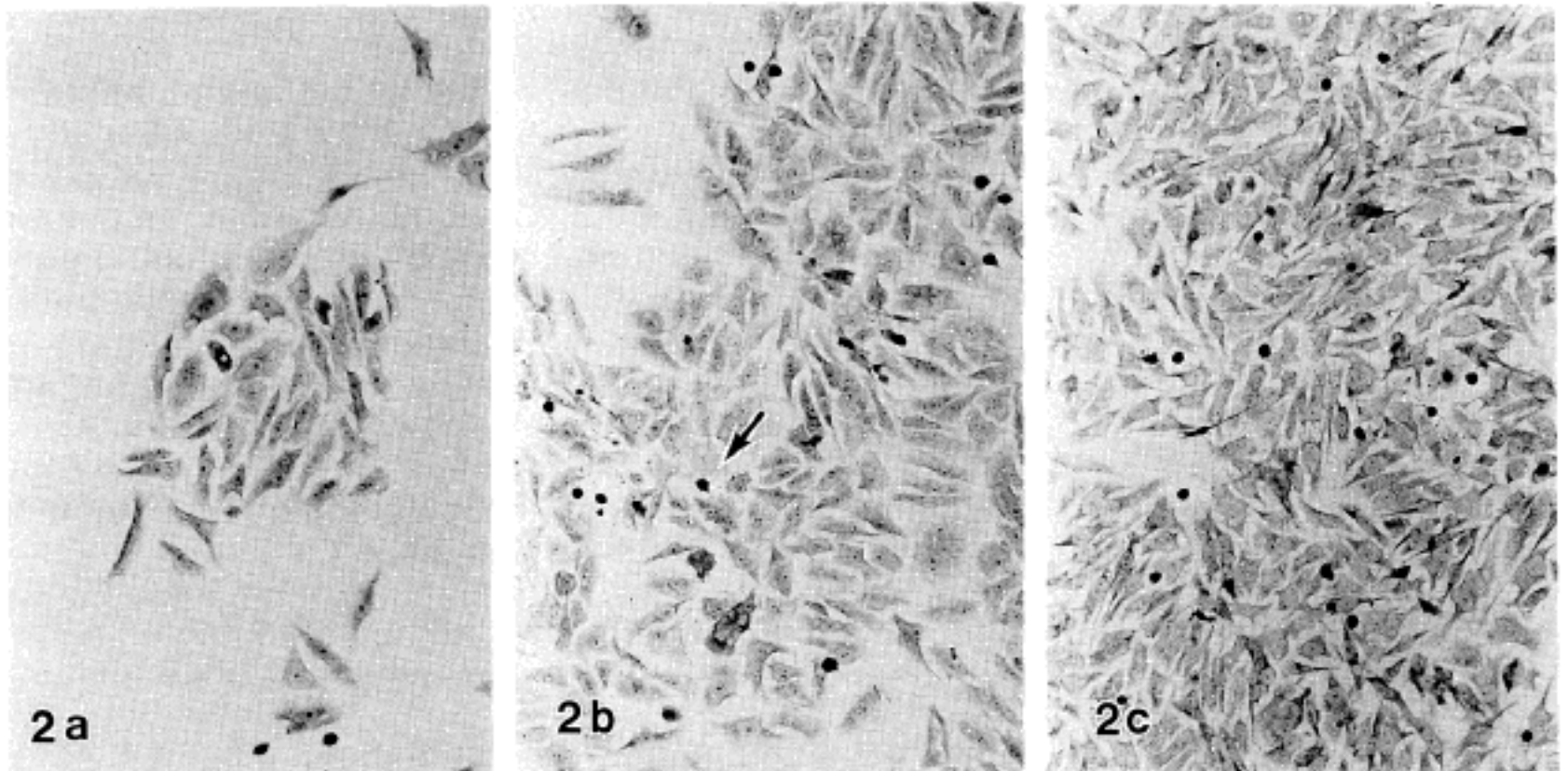
(1) 광학현미경적 관찰: ADR을 투여한 후 초기 반



**Fig. 1.** Cell viability % of HeLa cells after administration of adriamycin. There is decrease of cell viability of HeLa cells exposed to ADR in dose-dependant manner. Cells( $1 \times 10^6$ ) were cultured in 60 mm plastic dishes for 48 hr and then exposed to ADR at 0.1~100.0 µg/ml for 1 hr. The viable cells attached to the dish were counted.

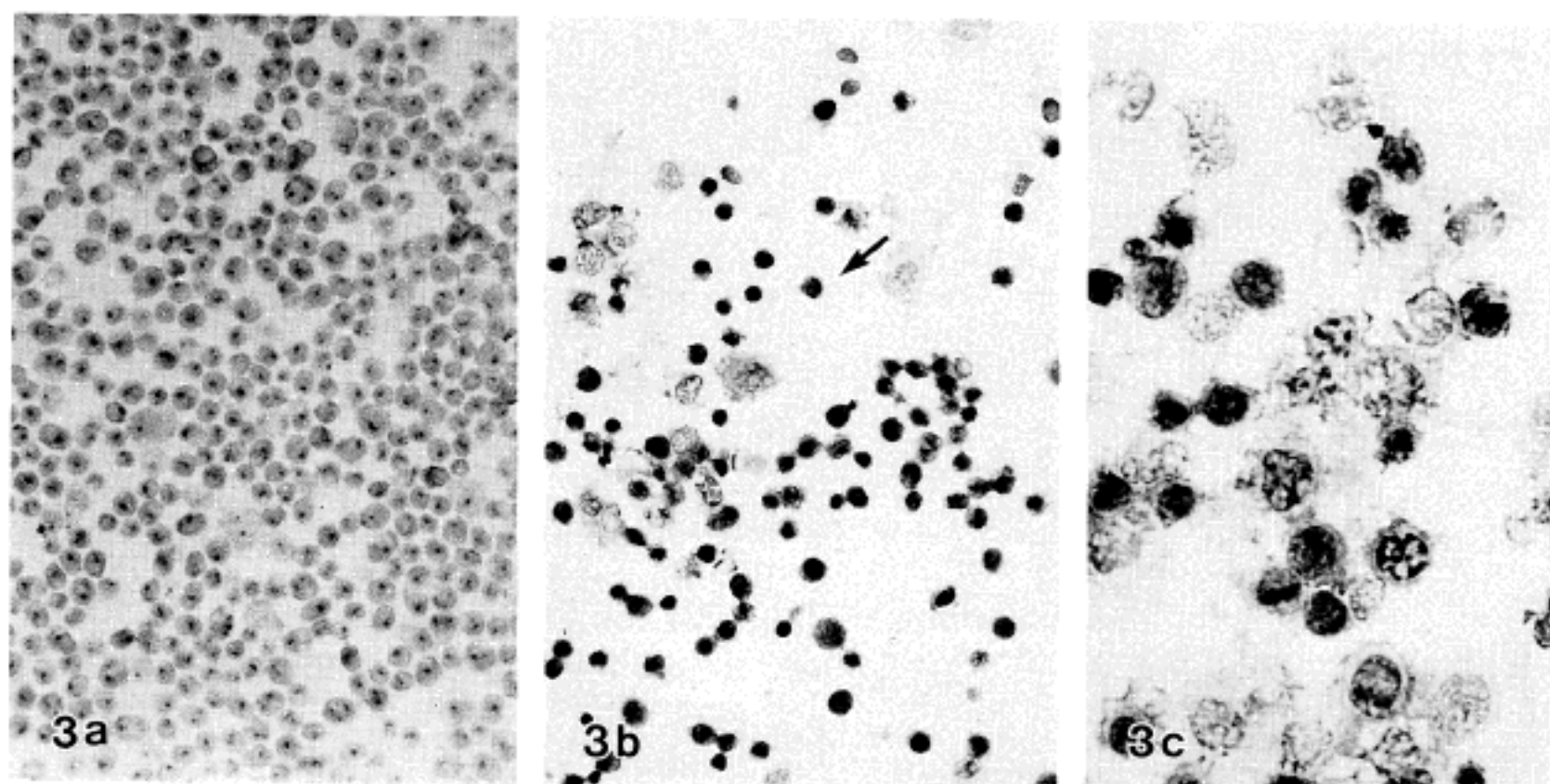
응(6시간)을 배양 접시에서 염색하지 않은 채로 관찰 하였을 때 10.0 µg/ml의 저농도의 ADR을 투여한 HeLa 세포에서는 변화가 거의 없었으나 100.0 µg/ml의 고농도의 ADR을 투여한 세포에서는 종종 세포의 수축을 일으켜 세포 간격이 넓어졌으며 세포의 모양은 동그랗게 줄어들었다. Giemsa염색에서 동그랗게 수축된 세포들은 세포막이 불규칙하고 공포가 형성 되었으며 핵은 작고 검게 농축되어 나타났다. ADR을 투여한 후 1일째의 HeLa 세포는 6시간째와 비슷한 양상을 보였다.

ADR을 투여한 지 3일지나 HeLa 세포들은 저농도 (0.1 µg/ml)의 ADR을 투여했을 때 고사 세포들이 드물게 보여 ADR을 투여하지 않은 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 2a). 0.4~4.0 µg/ml의 ADR을 투여했을 때 고사 세포 수가 좀더 증가하였고, 10.0~20.0 µg/ml의 ADR의 농도에서는 더욱더 많은 세포의 고사가 관찰되었으며(Fig. 2b) 40.0~100.0 µg/ml의 ADR 농도에서는 전체적으로 세포의 소실과 함께 더욱 증가된 수의 고사를 관찰할 수 있었다(Fig. 2c). HeLa 세포를 단일 세포 부유물로 만들어 cytopsin 한 후 Giemsa염색을 해 본 결과 ADR을 투여했을 때 검게 염색된 작은 고사 세포들이 출현하였다. ADR을 투여하지 않은 대조군의 HeLa 세포에서는 고사 세포는 드물었다(Fig. 3a). 이런 고사 세포들은

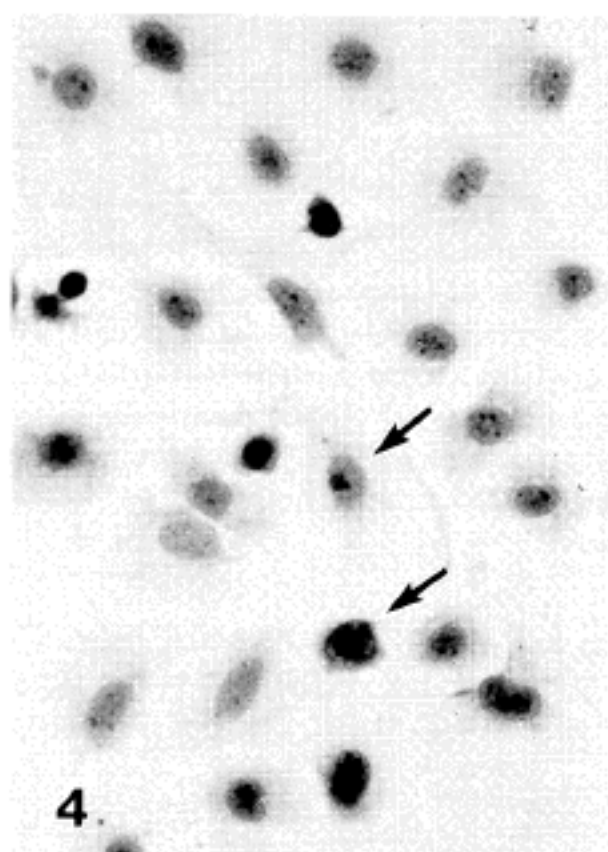


**Fig. 2.** HeLa cells exposed to adriamycin(ADR) at various dose for 1 hr, showing apoptotic cells by in situ trypan blue stain( $\times 100$ ). The apoptotic cells show shrinkage and condensation of nucleus and cytoplasm.(a) Untreated HeLa cells showing no apoptotic cells; (b) HeLa cells exposed to ADR at 10.0 µg/ml, showing increased number of apoptotic cells(arrow) (c) HeLa cells exposed to ADR at 100.0 µg/ml showing a markedly increased number of apoptotic cells.





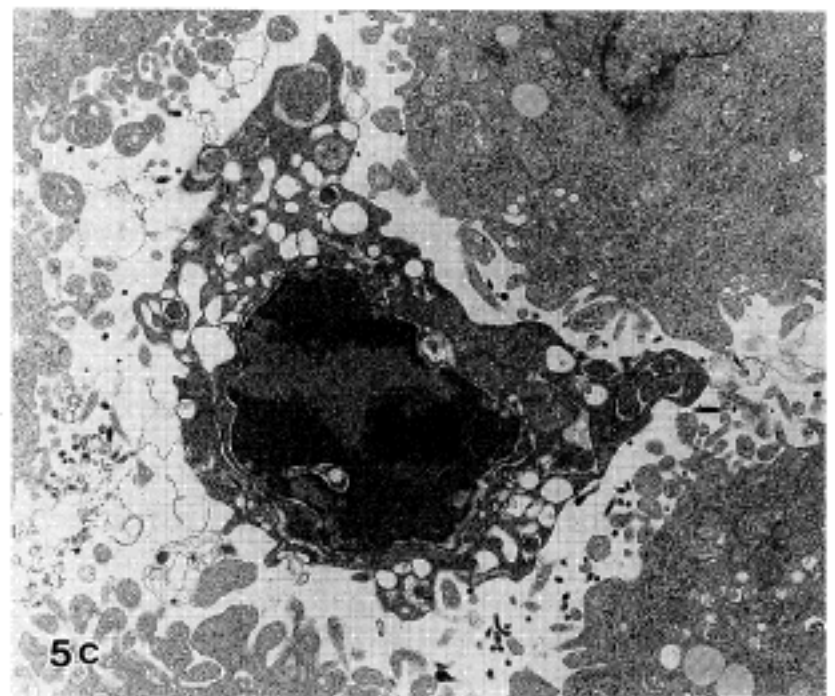
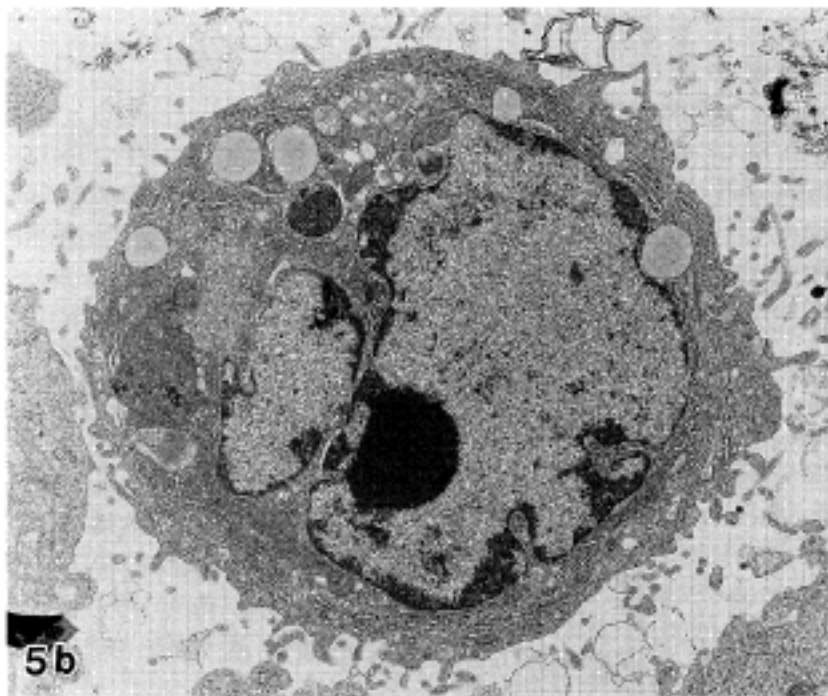
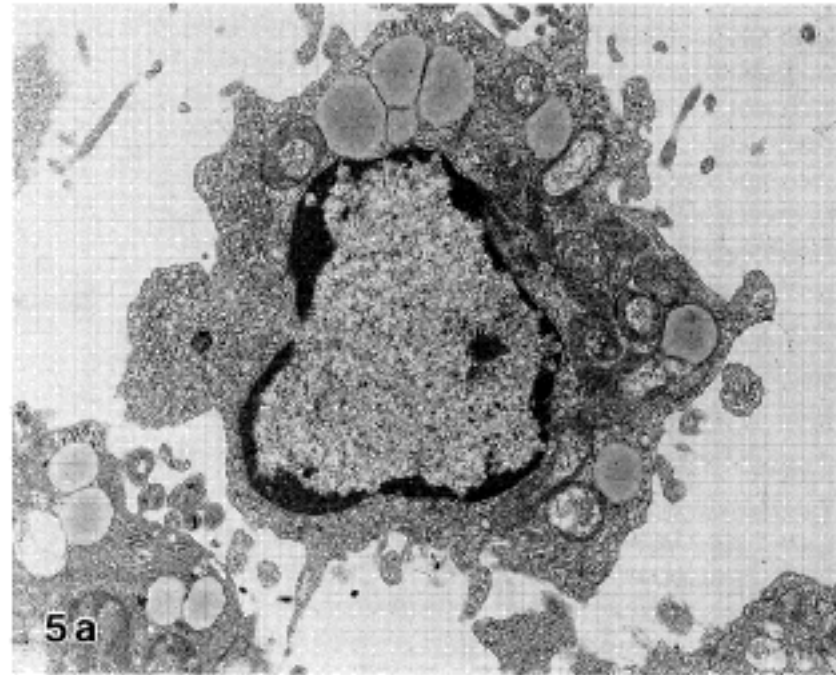
**Fig. 3.** HeLa cells by Giemsa-stained cytopsin preparations. (a) Untreated HeLa cells showing no apoptotic cells ( $\times 100$ ); (b) HeLa cells exposed to ADR at  $100.0 \mu\text{g/ml}$  showing apoptotic cells (arrow) with shrinkage necrosis in high percentage of cells ( $\times 100$ ); (c) HeLa cells exposed to ADR at  $20.0 \mu\text{g/ml}$  showing small shrunken apoptotic cells with nuclear condensation, fragmentation, and cytoplasmic condensation ( $\times 200$ ).



**Fig. 4.** HeLa cells exposed to ADR at a dose of  $20.0 \mu\text{g/ml}$  for 1 hr, showing apoptotic cells by in situ Giemsa stain ( $\times 100$ ). There were various nuclear changes with sharply delineated, irregular masses of condensed chromatin, abutting on the nuclear envelopes (arrow).

ADR농도의 증가에 따라 많아져서  $100.0 \mu\text{g/ml}$ 의 ADR농도에서 거의 반수를 차지하였다(Fig. 3b). 드물게 고사의 초기 단계의 소견인 핵의 농축 및 염색질의 핵연으로의 이동 및 핵이 부서진 작은 조각들과 피사와 구별하기 어려운 용해된 세포를 관찰할 수 있었으나(Fig. 3c) 고사체를 탐식한 세포들은 관찰되지 않았다. 고사를 일으킨 HeLa 세포의 형태는 고농도의 ADR을 투여했을 때 고사의 초기에 보이는 세포의 죽음과 동일한 양상으로 나타났다. ADR로 처리된 HeLa 세포의 핵은 농축을 수반하거나 혹은 농축없이 다양한 모양의 핵염색질을 나타내었는데 농염된 염색질의 큰 응괴가 핵막에 인접하여 있거나 중앙에 위치한 것이 있었고, 또한 농염된 염색질이 핵막 가장자리에 붙어 있으면서 핵의 가운데 위치한 큰 응괴와 연결된 것도 있었다(Fig. 4). 그러나 이들의 세포질은 농축되었거나 혹은 거의 변화가 없었다.

**2) 전자현미경적 관찰:** 고사가 일어나고 있는 세포에서는 흔히 핵의 농축을 볼 수 있었다. 핵은 전자 밀도가 높은 풍부한 이질 염색질을 갖고 핵의 모양과 크기는 매우 다양하였으며 불규칙한 핵막에 인접하여 이질 염색질의 응집을 나타내었다. 그리고 핵질의 중앙부위는 더욱 전자 밀도가 낮게 나타났다(Fig. 5a). 고사 세포의 세포질은 불규칙한 세포막의 모양과 함께 전자 밀도가 낮은 공포를 많이 형성하였고 팽창한 세



**Fig. 5.** Electron microscopic appearance of apoptosis in HeLa cells. (a, b) Morphologic characteristics of HeLa cells treated with ADR, 10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  showing early apoptotic cells with margination of nuclear chromatin (a) or sharply delineated mass of condensed chromatin abutting on the nuclear envelope(b). There are blebbing of cell surface and dilatation of endoplasmic reticulum under plasma membrane in cytoplasm (TEM, original magnification  $\times 6000$ ); (c) Later stage of apoptosis showing condensation of cytoplasm and nuclear chromatin with secondary degenerative changes(TEM, original magnification  $\times 6000$ ).

포질내세망의 끝부위가 가끔 세포막에 붙어 있었다 (Fig. 5b). 고사가 더욱 진행되면 세포가 수축되어 작아지면서 핵과 세포질의 농축을 보였다(Fig. 5c). 또한 미토콘드리아가 진하게 밀집된 것도 있었으나 대부분의 세포소기관들은 형태학적으로 비교적 안정된 모양을 유지하고 있었다.

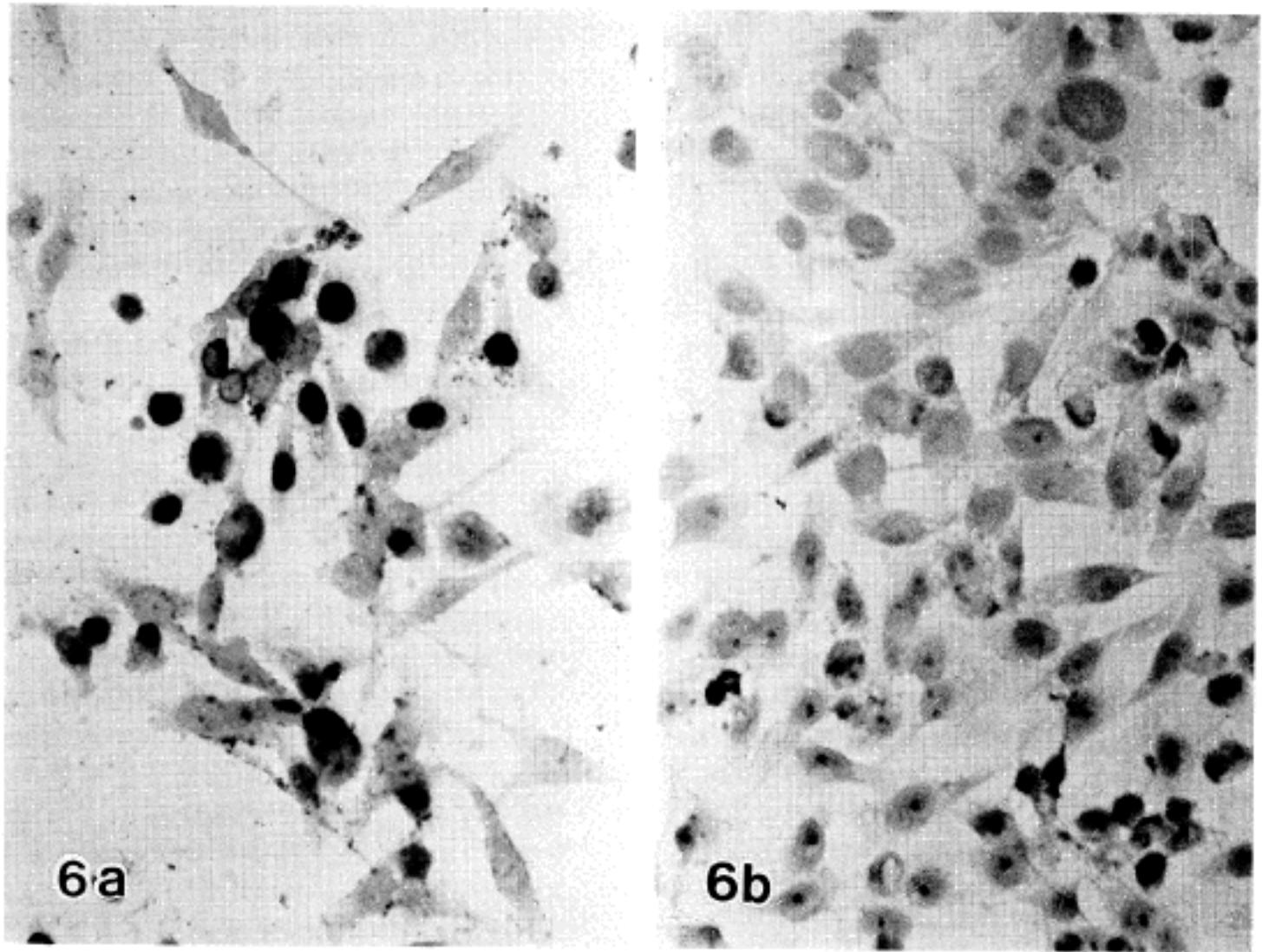
### 3. In situ Nick Translation 및 염색

양성 반응의 HeLa 세포들은 ADR이 0.1~0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도로 투여된 세포에서는 드물었고 ADR의 농도가 10.0~20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 가장 잘 관찰되었

다(Fig. 6a). ADR의 농도가 100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때는 거의 염색되지 않았다. ADR을 투여하지 않은 HeLa 세포에서는 대부분 염색되지 않았다(Fig. 6b).

### 고 찰

세포의 죽음은 괴사와 고사로 크게 두 가지로 분류할 수 있다<sup>10,12,27</sup>. 괴사는 외적 손상에 의한 병적 상태에서 일어나며 최근에 알려진 고사는 정상적 조직 크기의 보존, 배아 형성의 과정, 변태(metamorphosis), 호르몬에 의존하는 조직의 위축 등과 같은 생체 항상



**Fig. 6.** Visualization of apoptosis by in situ nick translation in HeLa cells. After nick translation in situ with biotinylated dUTP, incorporated biotinylated dUTP to DNA strand-break in the nuclei of HeLa cells were stained by streptavidin-biotin alkaline phosphatase method. (a) HeLa Cells exposed to ADR at 10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 hr showing intense nuclear staining; (b) untreated HeLa cells showing no staining.

성의 조절에 작용한다. 악성종양에도 관여함이 알려져 있는데 특히 종양의 크기가 감소할 때 고사의 빈도가 증가한다. 또한 glucocorticoids, 활성화된 T 임파구로부터 interleukin-2를 제거할 때, 전리 방사선이나 화학요법제의 사용에 의해서도 고사가 유도된다<sup>9-12,15-17</sup>.

이 실험에서 ADR을 처리한 HeLa 세포에서 관찰된 광학현미경적 변화는 핵과 세포질의 농축과 세포막의 수포 형성이 생겼고 농축된 핵염색체의 모양은 다양하게 나타났으며 드물게 핵의 분쇄를 관찰할 수 있었다. 투과전자현미경 소견에서 초기에는 이질 염색질의 핵막으로의 편재가 일어났으며 점차 불규칙한 핵막과 세포질의 소기관의 고밀도, 조면세포질내세망 끝부위의 팽창을 볼 수 있었다. 이러한 변화는 Duvall 및 Wyllie<sup>10</sup>와 Arends 및 Wyllie<sup>11</sup>가 기술한 고사의 형태와 일치하였다. 조직에서는 고사 과정에서 생긴 막성 구조물인 고사체가 주변 세포 혹은 대식 세포에 의해 인지되어 염증 반응을 일으키지 않고 탐식된다고 알려져 있다<sup>9-12</sup>. 이러한 죽어 가는 세포를 인지하는

기전으로 대식 세포의 vitronectin 수용체에 관한 연구가 있으나<sup>29</sup> 아직 고사의 확실한 기전 및 고사 주변의 상피 세포에 의해서 고사체가 탐식되는 기전이 밝혀져 있지 않다. 이 실험에서 ADR로 처리된 HeLa 세포들에서 탐식된 고사체를 관찰할 수 없었으며 시간이 경과함에 따라 고사 세포는 괴사와 구별하기 어려운 세포 용해 변화를 나타내었다. 이는 시험관내에서 생기는(in vitro) 고사의 운명으로 생각되며 이런 경우 고사는 괴사와 형태적으로 유사하여 이차적 괴사라고 불린다<sup>10</sup>. 고사는 대조군에서 거의 관찰되지 않았으며 고사율은 ADR로 처리된 HeLa 세포에서 증가되었는데 100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 44%로 증가하여 사용한 ADR양에 비례함을 알 수 있었다.

고사의 초기 변화로 알려진 핵체 사이를 연결하는 DNA 파괴는 세포막이 상실되기 전에 생겨 trypan blue exclusion에 의해 측정된다<sup>9-12,15-17</sup>. Glucocorticoid에 노출된 흉선 세포의 고사에 관한 연구에서 세포의 죽음이 일어나기 3~5시간 전에 DNA손상이 생긴다고 보고된 바 있다<sup>30</sup>. 핵체 사이의 연결 DNA



소화는 생화학적으로 겔 전기 영동에서 180~200 base pairs의 특징적인 분절을 나타낸다<sup>9-12, 15-17</sup>). 고사의 특징적 DNA 손상을 탐지하는 방법으로 분자생물학 기법에 흔히 사용되는 NT<sup>18)</sup>를 조직 혹은 배양한 세포의 DNA 손상을 발견하는 것에 응용한 연구들이 보고되고 있다<sup>8, 19, 20</sup>). 주로 tritium을 이용한 방사선 동위원소나 biotin, digoxigenin 같은 효소를 사용하여 핵이 손상된 부위에 DNA polymerase I이 작용하여 반응 부위에 방사선 동위원소를 사용한 경우 자가방사능기법에 의해 알갱이(grain)로 나타난다. Biotin과 같은 방사선 동위원소가 아닌 효소를 사용하여 실험에서와 같이 avidin-biotin방법을 사용하면 발색 물질에 따라 다양한 색깔로 발색되어 DNA 손상 여부를 알 수 있게 된다. 이것은 alkaline elution방법<sup>21)</sup>과 달라 기술적으로 빠르고 방사능으로 표지된 DNA를 필요로 하지 않으며 소량의 세포 수에도 적용이 가능하며 분열하지 않거나, 세포 분열이 느린 모든 세포에 사용될 수 있다. Maehara등<sup>8)</sup>의 연구에서 ADR을 처치한 후 세포생존율은 감소되었는데 자가방사능기법을 이용하여 NT하였을 때 대조 세포의 핵의 알갱이보다 ADR로 처치된 세포들의 알갱이들의 숫자는 훨씬 증가되었고 특히 20.0 µg/ml의 ADR 농도에서 약 15배 증가되어 ADR 용량의 증가에 따라 알갱이의 수가 증가됨을 보고하였다<sup>8)</sup>. 이 실험에서 biotinylated dUTP를 사용한 ISNT를 이용하여 ADR으로 처치한 HeLa 세포의 핵을 관찰한 결과 아주 강한 양성 반응으로 염색되어 분명한 DNA가닥의 파괴가 일어났음을 알 수 있었으며 발색 정도가 10.0~20.0 µg/ml의 ADR 농도에서 가장 잘 염색되었다. Biotinylated dUTP를 사용한 ISNT는 자가방사능기법을 이용한 것보다 발현되는 정도는 다소 낮고 정량 검사가 불가능하지만 자가방사능기법에서 방사능으로 표지된 DNA를 추적하기 위해 수주일동안 노출해야 하는 것 보다 시간도 오래 걸리지 않고 또한 ISNT로 발색된 위치에 대해 자세한 세포학적 분석을 가능하게 하는 등 장점이 있다<sup>20)</sup>.

대부분의 항암제가 직접 작용하는 세포의 표적은 잘 알려져 있으나 약제와 표적과의 상관관계만으로 세포를 죽이는 기전이 잘 설명되지 않고 있다. ADR의 작용 기전에 대한 연구는 여러 문헌에서 볼 수 있으나 아직 확실한 기전은 밝혀져 있지 않다<sup>1-7)</sup>. ADR이 핵의 DNA에 침투하여 DNA증식, RNA와 단백질 합성을 막는다고 알려져 있다. 약제가 없는 기근이 형성된다는 설이 있는데 이것은 ADR의 가장 심각한 부작용인 심근증의 발생에 의해 잘 이해 될 수 있다. 즉 ADR은 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, the reduced form)에 의존하는 환원제에 의해 semiquinone이 없는 기근으로 환원하여 산소 분자와 작용하여 superoxide, 과산화수소, 수소 기근을 만든다. 이와 같이 ADR이 심근에 산소

기의 형성을 자극하고 동시에 심장이 산소기에 대항하는 주요 기전을 소실하여 세포 독성을 나타내게 된다는 것이다<sup>1-3)</sup>. 그런데 ADR이 약제가 없는 기근을 형성하여 세포의 심한 손상을 초래하기 위해서는 철(iron)이 필요하며, 철과 doxorubicin의 복합체는 유리 기근의 반응을 촉매하는 큰 작용을 한다. 이와 같은 근거로 전이 금속 이온의 킬레이트화를 주장하는 학자도 있다<sup>1, 3, 4)</sup>.

ADR은 세포막의 작용에도 영향을 미친다고 알려져 있다. ADR은 세포막의 인지질과 상호 작용하는데 지질구조와 결합하여 유동성 변화와 같은 세포막 구조의 이상을 초래하여 세포막의 독성을 나타냄이 알려졌다<sup>2)</sup>. Tritton<sup>4)</sup>은 ADR이 세포막에 작용하여 인지질의 교체의 증가로 인해 세포내 diacylglycerol이 증가되어 PKC를 활성화시키고 이것이 topoisomerase II를 포함한 많은 기질의 인산화를 증가시켜 DNA 손상을 일으키는 기전의 하나로 설명하였다<sup>4)</sup>. ADR에 저항하는 세포는 세포내 약물 축적이 세포막의 투과성을 감소시켜 세포 독성을 일으키며 이는 P-glycoprotein이라고 불리는 세포막 당단백질의 합성에 의해 조절된다고 알려져 있다<sup>22, 23)</sup>. Pritchard와 Butler<sup>23)</sup>는 간세포에서 dimethyl-nitrosamine에 의해 유도된 고사에서 세포막 당단백의 변화를 보고하였고, 이것이 고사의 주요 기전일 것이라고 제시하였다. 이 실험에서 ADR을 투여한 뒤 조기 반응(6시간)에서 ADR의 농도가 낮았을 때 고사 세포의 수가 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나 100.0 µg/ml의 높은 ADR의 농도에서 고사 세포 수가 많이 증가하였는데 이는 세포막과 ADR의 농도 사이에 관계가 있을 것으로 생각된다. 최근에 ADR이 DNA와 결합함으로써 topoisomerase II에 작용하여 핵의 DNA가닥의 파괴를 일으켜 세포 독성을 초래함이 보고되었다<sup>4-7)</sup>. 임상적으로 ADR에 효과가 적은 종양에서 DNA가닥의 파괴되는 빈도가 낮았다<sup>8, 21)</sup>. Evans<sup>33)</sup>는 ADR에 노출된 흰쥐의 유방암 세포 클론의 생존 여부는 DNA가닥의 파괴가 생기는 빈도와 관련됨을 보고하였으며 DNA가닥의 파괴의 정도는 ADR이 세포 독성을 나타내는데 절대적 요소라고 기술하였다. 이 실험에서도 ISNT방법으로 DNA가닥의 파괴를 증명할 수 있었다.

이 실험에서 ADR로 유도된 HeLa 세포의 손상에서 초기에 세포질의 소포형성을 관찰할 수 있었는데 이는 Ca<sup>++</sup>이온의 증가와 actin을 포함한 세포 골격을 형성하는 단백질의 재배열과 관계가 있음이 알려져 있다<sup>34, 35)</sup>. 또한 전자현미경 소견에서 팽창된 내형질세망의 말단 부위가 세포막에 붙어 있는데 이것이 세포내 Ca<sup>++</sup>이온의 조절과 관계가 있는지도 추후 연구해 볼 필요가 있다고 생각된다.

이상의 실험에서 HeLa 세포를 이용하여 ADR을 처치한 후 유도되는 세포의 죽음이 광학현미경 및 전자현미경을 사용하여 형태학적으로 고사와 일치함을



알 수 있었고 ADR의 농도의 증가에 따라 HeLa 세포의 고사 지수가 증가하였다. Biotinylated dUTP를 사용한 ISNT를 이용하여 HeLa 세포핵의 DNA 가닥의 파괴를 관찰할 수 있었고 이는 ADR의 농도가 10.0~20.0  $\mu\text{g/ml}$ 에서 잘 나타났다. 비교적 세포질의 변화는 없으면서 핵의 다양한 형태학적 변화와 함께 ISNT에 의한 DNA 손상을 고려해 보면 ADR에 의한 고사의 한 기전으로 DNA 가닥의 파괴가 관계가 있음을 제시한다. 그리고 형태학적으로 ADR에 의한 조기세포독성에 관한 한 추적 방법으로 ISNT방법이 도움이 될 것이라고 생각한다.

## 결 론

HeLa 세포주를 이용하여 중요한 항암제의 하나인 ADR을 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 0.2  $\mu\text{g/ml}$ , 0.4  $\mu\text{g/ml}$ , 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , 2.0  $\mu\text{g/ml}$ , 4.0  $\mu\text{g/ml}$ , 10.0  $\mu\text{g/ml}$ , 20.0  $\mu\text{g/ml}$ , 40.0  $\mu\text{g/ml}$ , 100.0  $\mu\text{g/ml}$ 까지 각기 다른 농도를 만들어 1시간 동안 HeLa 세포에 투여하여 3일후에 ADR 농도에 따른 HeLa 세포의 고사 지수를 측정하고, ADR 투여후 초기(6시간, 1일) 및 3일뒤에 광학현미경 및 투과 전자현미경으로 관찰하여 세포 독성으로 나타나는 HeLa 세포의 죽음이 고사임을 밝히고, 또한 ADR에 의한 고사의 기전으로 DNA 가닥의 파괴(DNA strand break)와의 관계를 알기 위하여 실험을 한 결과는 다음과 같다.

1) 세포의 생존율은 ADR의 농도가 증가함에 따라 감소되었으며, 반면 고사 지수는 증가되었다. 100.0  $\mu\text{g/ml}$ 의 ADR 농도에서 세포의 생존율은 56%였다. ADR을 투여한 후 초기(6시간)에서 HeLa 세포들은 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도를 투여하였을 때는 많은 고사 세포들을 보였으나 저농도에서는 고사 세포를 관찰할 수 없었다.

2) 광학현미경적 소견상 HeLa 세포는 ADR 투여 후 핵과 세포질의 농축과 불규칙한 세포막을 나타내었다. 핵은 주변과 뚜렷이 구별되는 농염된 염색질의 큰 응괴가 핵막에 인접하여 핵의 가장자리나 중앙 부위에 위치한 것을 포함하여 다양한 형태를 보였으나 세포질은 거의 변화를 일으키지 않았거나 농축되어 나타났다. 투과전자현미경적 소견상 이질 염색질의 핵막으로의 편재, 세포막하 팽창된 세포질내세망, 소기관의 고밀도와 정상적인 형태의 미토콘드리아, 불규칙한 세포막, 수포 형성 및 핵막의 분쇄가 관찰되었다.

3) Biotinylated dUTP를 이용한 ISNT는 핵에 아주 강한 양성 반응을 보였으며 10.0~20.0  $\mu\text{g/ml}$ 의 ADR 농도에서 가장 뚜렷하게 관찰되었다.

이상의 성적으로 HeLa 세포의 ADR에 의한 죽음은 형태학적으로 고사이며 ADR의 농도의 증가에 따라 고사 지수가 증가하였다. Biotinylated dUTP를 사용한 ISNT로 이용하여 DNA 가닥의 파괴가 확인

된 바 이 ISNT소견과 핵의 다양한 형태학적 변화를 고려하면 ADR에 의해 HeLa 세포가 고사를 일으키는 기전의 하나로 핵체 사이에 있는 DNA 가닥의 파괴가 관계있을 것으로 추정된다. 그리고 형태학적으로 ADR에 의한 조기 세포 독성에 관한 추적 방법으로 biotinylated dUTP를 사용한 ISNT이 도움이 될 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Chabner BA, Myers CE. Anthracyclines. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer: principles and practice of oncology, Vol I. 3rd ed., Philadelphia, JB Lippincott Co, 1989; 376-80.
- 2) Friedmann CA. Structure-activity relationships of anthraquinones in some pathological conditions. *Pharmacology* 1980; 20: 113-22.
- 3) Calabresi P, Chabner BA. Daunorubicin and doxorubicin. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, eds. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Vol II, 8th ed, New York, Pergamon Press, 1991; 1241-4.
- 4) Tritton TR. Cell Death in Cancer Chemotherapy: The Case of Adriamycin. In: Tomei LD and Cope FO, eds. Apoptosis: The molecular basis of cell death, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991; 121-38.
- 5) Mikklesen RB, Lin PS, Wallach DF. Intercalation of adriamycin with human red blood cells: A biochemical and morphologic study. *J Mol Med* 1977; 2: 33-40.
- 6) Lin LF, Rowe TC, Yang L. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 1983; 258: 15365-70.
- 7) Tewey KM, Chen GL, Nelson EM, Liu LF. Intercalative anticancer drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 1984; 259: 9182-7.
- 8) Maehara Y, Emi Y, Anai H, Sakaguchi Y, Kohnoe S, Tsujitani S, Sugimachi K. Adriamycin-induced DNA strand breaks in HeLa and in P388 leukemia cells detected using in situ nick translation. *J Pathol* 1989; 159: 323-7.
- 9) Wyllie AH, Morris RG, Smith RL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142: 67-77.
- 10) Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunology Today* 1986; 7: 115-9.
- 11) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis-mechanisms and roles in pathology. *Inv Rev Exp Pathol* 1991; 32: 223-54.

- 12) Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. *Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. Anticancer Res 1990; 10: 1153-60.*
- 13) 김상표, 권건영, 이상숙, 정재홍. 백서 췌관 결찰 후 선방 세포 위축의 기전. *대한병리학회지 1989; 23: 51-64.*
- 14) 김찬환, 박관규, 권건영, 이상숙, 장은숙. 자궁 경부 편평상피암에서 자연 발생하는 apoptosis에 관한 연구. *대한병리학회지 1990; 24: 254-66.*
- 15) Baxter GD, Collins RJ, Harmon BV, Kumar S, Prentice RL, Smith PJ, Lavin MF. *Cell death by apoptosis in acute leukaemia. J Pathol 1989; 158: 123-9.*
- 16) Takano YS, Harmon BV, Kery JFR. *Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumor cell lines: A study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. J Pathol 1991; 163: 329-36.*
- 17) Rotello RJ, Hocker MB, Gerschenson LE. *Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. Am J Pathol 1989; 134: 491-5.*
- 18) Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. *Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol 1977; 113: 237-51.*
- 19) Iseki S. *DNA strand breaks in rat tissue as detected by in situ nick translation. Exp Cell Res 1986; 167: 311-26.*
- 20) Iseki S, Mori T. *Histochemical detection of DNA strand scissions in mammalian cells by in situ nick translation. Cell Biol Int Rep 1985; 9: 471-7.*
- 21) Capranico G, Dasdia T, Zunino F. *Comparison of doxorubicin-induced DNA damage in doxorubicin-sensitive and resistant P388 murine leukemia cells. Int J Cancer 1986; 37: 227-31.*
- 22) Kartner N, Shales M, Riordan JR, Ling V. *Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. Cancer Res 1983; 43: 4413-9.*
- 23) Inaba M, Kobayashi H, Sakurai Y, Johnson RK. *Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. Cancer Res 1979; 39: 2200-3.*
- 24) Ganapathi R, Grabowski D. *Differential effect of the Calmodulin inhibitor trifluoperazine in modulating cellular accumulation, retention and cytotoxicity of doxorubicin in progressively doxorubicin resistant L1210 mouse leukemia cells. Lack of correlation between cellular doxorubicin levels and expression of resistance. Biochem Pharmacol 1988; 37: 185-93.*
- 25) Luft JH. *Improvement in epoxy resin embedding method. J Biophysic Biochem Cytol 1961; 9: 409-17.*
- 26) Watson ML. *Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J Biophysic Biochem Cytol 1958; 6: 475-9.*
- 27) Reynolds ES. *The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17: 208-12.*
- 28) Ueda K, Nakata M, Urata Y, Konishi E, Itoi H, Ashihara T. *Detection of DNA injury by in situ nick translation: effects of fixation and air-drying on nuclear DNA. J Clin Exp Med 1990; 152: 247-8.*
- 29) Savill J, Pransfield I, Hogg N, Haslen C. *Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature 1990; 343: 170-3.*
- 30) Cohen JJ, Duke RC. *Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. J Immunol 1984; 132: 38-42.*
- 31) Kohn KW, Erickson LC, Ewing RAG, Friedman CA. *Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. Biochemistry 1976; 15: 4629-37.*
- 32) Pritchard DJ, Butler WH. *Apoptosis-the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicity. J Pathol 1989; 158: 253-60.*
- 33) Evans DP, Meyn RE, Tomasovic SP. *Survival of rat mammary tumor cell clones and DNA strand damage following adriamycin treatment. Cancer Chemother Pharmacol 1986; 18: 137-9.*
- 34) Smith MW, Phelps PC, Trump BF. *Cytosolic Ca<sup>2+</sup> deregulation and blebbing after HgCl<sub>2</sub> injury to cultured rabbit proximal tubule cells as determined by digital imaging microscopy. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 4926-30.*
- 35) Nieminen AL, Gores GJ, Dawson TJ, Herman B, Lemasters JJ. *Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. J Biol Chem 1990; 265: 2399-408.*